

Aus dem Institut für Anatomie  
der medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Identifikation von SNARE-Proteinen im  
Urothel der Ratte**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae

Vorgelegt der medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität Berlin  
von

Martin Ludovico Born

Dekan: Prof. Dr. med. J. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Bigalke  
2. PD Dr. med. F. Schmitz  
3. PD Dr. rer. nat. T. Jöns

eingereicht: 04. Januar 2002

Datum der Promotion: 23. September 2002

## Abstrakt

Die Deckzellen des Urothels sind die einzigen Zellen, die mit dem Urin über einen längeren Zeitraum in direktem Kontakt stehen. Ihre apikale Plasmamembran weist ein facettiertes Aussehen auf und hat dicht gepackte Uroplakin III Moleküle eingelagert, die durch Ausbildung von hexagonalen Proteinkomplexen entscheidend sind für die hohe chemische Resistenz, gegen die zum Teil zellschädigende Zusammensetzung des Urins. Unterhalb der apikalen Plasmamembran befinden sich zahlreiche diskuide Vesikel. Diese entsprechen in ihrem molekularen Membranaufbau der apikalen Membran und können als präapikale Reservemembran angesehen werden, die bei Bedarf in die apikale Plasmamembran eingebaut werden kann. In der vorliegenden Arbeit ist untersucht worden, in wieweit SNARE-Proteine für die Fusion zwischen den diskuiden Vesikeln und der apikalen Plasmamembran von Bedeutung sind. In Immunoblotanalysen wurde das Vorkommen von Synaptobrevin, Syntaxin, SNAP23, NSF und alpha,beta-SNAP gezeigt und es konnte in Immunopräzipitationen die Ausbildung des SNARE-Haftkomplexes nachgewiesen werden. Immunfluoreszenz Untersuchungen und Immunogoldmarkierungen bestätigten das Vorhandensein von SNARE-Proteinen und wiesen durch das subzelluläre Verteilungsmuster der Proteine auf einen kombinierten homotypischen und heterotypischen Fusionsmechanismus hin. Hinweise auf eine mit der Fusion der Vesikel gleichgeschaltete Endozytose wurden nicht gefunden, das Abknospen von Membranbestandteilen der apikalen Zellmembran konnte jedoch ultrastrukturell gezeigt werden. Ein weiterer Hinweis auf eine möglicherweise kontinuierliche Erneuerung der apikalen Zellmembran der Deckzellen konnte durch den Nachweis von Uroplakin III im Urin von gesunden Probanden gebracht werden. In einem Zentrifugationsexperiment wurde Uroplakin III in Fraktionen von Membranaggregaten sehr unterschiedlicher Größe nachgewiesen, was die ultrastrukturellen Befunde, die das Abknospen sowohl von einzelnen Vesikeln wie auch von größeren Membranbestandteilen zeigten, bestätigt.

Schlagworte: Urothel, Uroplakin, SNARE, homotypische Fusion

## **Abstract**

The luminal surface of the bladder epithelium is continuously exposed to the urine that differs in ionic composition and osmolarity from blood. The apical plasma membrane of facet cells, facing the urine, is covered with rigid-looking plaques consisting of hexagonal uroplakin-particles. Together with tight junctions these plaques form a specialized membrane compartment that represents one of the tightest and most impermeable barrier of the body. Plaques also occur in the membrane of cytoplasmic discoid vesicles. Here we show that synaptobrevin, SNAP23, syntaxin, NSF and alpha/beta-SNAP are perfectly colocalized with uroplakin III at the apical plasma membrane and with the membrane of discoid vesicles. This distribution suggests that discoid vesicles of a homotypic and heterotypic fusion events. Furthermore we detected uroplakin III containing membranes of different size in the urine of healthy humans and rats. probably facet cells maintain their permeability barrier by a process of membrane renewal where pieces of the apical membrane are continuously taken off by freshly fused discoid vesicles.

Keywords: urothelium, uroplakin, SNARE, homotypic Fusion

„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an, interessant zu werden,  
wo sie aufhört.“

*Justus von Liebig*



# **1 Inhaltsverzeichnis**

2	Einleitung	2-8
2.1	Anatomie der Harnblase	2-8
2.2	Übersicht über das Harnblasenepithel	2-10
2.3	Prinzipien der Membranfusionen	2-14
2.4	Die SNARE–Hypothese	2-15
3	Fragestellung und Ziel der Arbeit	3-18
4	Materialien und Methoden	3-19
4.1	Chemikalien und Reagenzien	3-19
4.2	Puffer und Lösungen	3-22
4.3	Verwendete Antikörper	3-25
4.4	Verwendete Geräte	3-27
4.5	Durchführung der Experimente	3-27
4.5.1	Membranpräparation des Harnblasenepithels	3-27
4.5.2	Protein–Gelelektrophorese und Westernblot–Analyse	3-28
4.5.3	Immunopräzipitation	3-29
4.5.4	Proteinfällung	3-30
4.5.5	Urinzentrifugation	3-30
4.5.6	Indirekte Immunofluoreszenzmikroskopie	3-31
4.5.7	Elektronenmikroskopie	3-31
4.6	Statistische Methoden	3-33
5	Ergebnisse	5-34
5.1	Morphologie	5-34
5.2	Detektion von SNARE–Proteinen im Urothel der Rattenharnblase	5-38
5.2.1	Immunofluoreszenz	5-38
5.2.2	Westernblotanalyse	5-40
5.2.3	Ultrastrukturelle Lokalisation	5-43
5.3	Ausbildung des SNARE–Haftkomplexes im Urothel der Ratte	5-50
5.4	Detektion von Uroplakin als Deckzellprotein im Urin	5-53
5.4.1	Westernblotanalyse	5-53
5.4.2	Ultrastruktur des Urinsediments	5-55
6	Diskussion	5-56
6.1	Terminologie	5-56
6.2	SNARE–Proteine im Urothel der Ratte	5-56
6.3	Modell der homotypischen Fusion in Deckzellen	5-59

6.4	Uroplakin	5-61
7	Zusammenfassung	5-65

## **2 Einleitung**

Die Erforschung molekularer Strukturen ist seit Jahrzehnten eine Aufgabe der modernen Anatomie und Zellbiologie. Die Analysen und Entdeckungen bilden die morphologischen Grundlagen, um fachübergreifende Zusammenhänge subzellulärer Strukturen zu verstehen. So wurde ein enormer Wissenszuwachs auf dem Gebiet verschiedener zellbiologischer Funktionen erreicht. Einen wichtigen Fundus stellt dabei die Grundlagenforschung dar, die für klinische Anwendungen und breite medizinische Neuerungen Nutzen bringt. Durch die immer detaillierteren Erkenntnisse wurde die Blickrichtung der molekularen Zellbiologie beeinflusst.

Die Beschreibung der Mechanismen der exozytotischen Transmitterfreisetzung in Neuronen stand bisher im Interesse der neuroanatomischen Forschung. Das besondere Interesse galt der dabei erforderlichen Membranverschmelzung, die eine Transmitterfreisetzung erst ermöglicht. Es konnten Modelle entwickelt werden, welche einen Einblick in die Prinzipien der Verschmelzung von Membranen erlauben. Neuerdings werden diese Modelle modifiziert auch bei nicht-neuronalen Zellen diskutiert. So wurden Hepatozyten (Fujita et al., 1998), Sammelrohrzellen der Niere (Jo et al., 1995) oder Parietalzellen des Magens (Jöns et al., 1999; Peng et al., 1997) hinsichtlich dieser Aspekte betrachtet. Vor diesem Hintergrund werden in der vorliegenden Arbeit die Mechanismen in Epithelzellen des Urothels der Ratte untersucht.

### **2.1 Anatomie der Harnblase**

Beim Menschen befindet sich die Harnblase zum Teil extraperitoneal im kleinen Becken, zum Teil subperitoneal bzw. präperitoneal hinter der Symphyse. Ventral gelangen die dem Levatorschenkel anliegenden Ligamenta pubovesicalia zum Blasenhalshals, dorsal ist die Harnblase über das Ligamentum rectovesicale verbunden. Beim Mann ist die Harnblase fest mit der Prostata verwachsen. Bei der Frau ist die Harnblase an der Vorderwand der Vagina und der Cervix uteri gelegen, wobei eine weit weniger starke Fixierung der Harnblase ausgebildet ist. Über die Ligg. vesicosacralia ist die Harnblase zusätzlich an der Vorderfläche des

Kreuzbeines fixiert.

Als glattmuskuläres Hohlorgan sammelt sie den Urin aus den Nieren. Der Urin erreicht die Harnblase über die beiden Ureteren, die Harnleiter. Die physiologisch gefüllte Harnblase fasst durchschnittlich 350 ml. Die Form der Harnblase wechselt stark mit dem Füllungszustand und gewinnt so auch Einfluss auf die Lage der benachbarten Organe, wie den anliegenden Organabschnitten von Ileum oder Rectum.

Die Muskelschicht wird in drei Hauptlagen unterteilt: Eine innere und eine äußere jeweils längs verlaufende sowie eine mittlere mehr ringförmig verlaufende Schicht, die alle durch zum Teil abbiegende Verlaufsrichtungen miteinander in Verbindung stehen (Abb. 1) . Das Peritoneum überzieht den dorsalen Bereich und schlägt dann auf das Rectum über.

Die Miktion wird durch die Erschlaffung der Muskeln im Bereich der Harnröhrenöffnung eingeleitet. Infolge von Kontraktionen der Ringfasern nimmt bei der Blasenentleerung der horizontale Durchmesser ab und der vertikale Durchmesser zu. Der Druck der von oben lastenden Bauchorgane gegen die vertikale Achse führt zu einer Abknickung der Harnblase gegen die Harnröhre. Dadurch werden die Mm. pubovesicales gespannt und die Öffnung des Ostium urethrae internum nach vorn erweitert. Durch die Reduzierung des horizontalen Blasendurchmessers verringert sich der venöse Gefäßtonus infolge der Muskelspannung, so dass die venösen Geflechte des Uvulapolsters entleert werden. Längsfasern der Tunica muscularis, die in die Uvula ausstrahlen, werden durch die seitliche Ausdehnung gespannt und ziehen somit die Uvula zusätzlich aus dem Ostium urethrae int. der Harnblase. Die mechanische Abflussbehinderung des Urins durch die Uvula ist dadurch aufgehoben.

Die Versorgung der Harnblase mit Sauerstoff, Wärme und Nährstoffen erfolgt über die Aa. vesicales superiores, Äste aus der A. umbilicalis und aus der A. vesicalis inferior, einem Ast aus dem parietalen Abschnitt der A. iliaca interna. Das Blut des submukösen, intramuskulären und superfiziellen Venenplexus wird beim Mann über den Plexus venosus vesicoprostaticus abgeleitet und mündet in die Vv. iliacae internae. Bei der Frau erfolgt der venöse Abfluss auch über ein ausgeprägtes Venengeflecht, das Corpus spongiosum urethrae.

Die nervale Versorgung der Harnblase erfolgt über sympathische Fasern aus dem

lumbalen Lendenmark und parasympathische Fasern aus dem Sakralmark. Der Blasenwand liegt ein vegetativer Plexus an; die Reflexzentren für die Füllung und Entleerung der Harnblase liegen im Lumbal– bzw. Sakralmark. Die übergeordneten Zentren befinden sich im Hirnstamm. Der sympathische Teil regelt durch ein Nachlassen der Wandspannung die Füllung, der parasympathische Teil, aufgrund der Kontraktion des M. detrusor vesicae, die Entleerung.

Mit dem Urin werden Stoffwechselendprodukte ausgeschieden. Dazu gehören als Hauptbestandteile zum einen Harnstoff aus dem Stickstoffwechsel und zum anderen Kreatinin, dass sich durch Zyklisierung aus Kreatin spontan bildet und das Endprodukt des Muskelstoffwechsels ist. Urochrome, die beim Hämoglobinabbau entstanden, färben den Urin gelblich. Als Stellglied im Flüssigkeitshaushalt reguliert die Niere das Flüssigkeitsvolumen des Körpers und kann somit auf die Druckregulierung des Herzkreislaufsystems einwirken. Über die Ausscheidung bzw. Rückresorption von Ionen stellt die Niere einen wichtigen Regulationsmechanismus des Blut-pH-Wertes dar. Das Säure–Basen–Verhältnis des Körpers kann so über die Urinausscheidung reguliert werden.

Physiologischerweise entstehen 0,5 bis 2 l Urin pro Tag. Der pH-Wert des Urins kann eine große Schwankungsbreite von etwa 4,5 bis über 8,3 aufweisen.

Mit dem Urin werden verschiedene Ionen ausgeschieden und es befinden sich auch unter physiologischen Bedingungen Proteine im Urin. Die Proteinausscheidung kann bis zu 200 mg pro Tag betragen. Modifizierte Aminosäuren–Derivate, wie Hydroxyprolin aus dem Kollagenstoffwechsel, werden als diagnostische Marker genutzt. Des Weiteren werden Metabolite verschiedener Hormone oder Hormone selbst über den Urin ausgeschieden, die ebenfalls als Marker klinisch von Bedeutung sind. So wird z.B. der Nachweis von Choriongonadotropin im Urin als immunologischer Schwangerschaftsnachweis benutzt.

## **2.2 Übersicht über das Harnblasenepithel**

Nach innen ist die Tunica muscularis durch eine lockere Tela submucosa mit der Schleimhaut, der Tunica mucosa, verbunden (Abb. 1). Im Bereich des

Blasengrundes, dem Trigonum vesicae, kommt keine Submukosa vor. Die harnleitenden Organe sind von einem hochdifferenzierten Epithelgewebe, dem Übergangsepithel, ausgekleidet. Hierbei handelt es sich um ein mehrreihiges bis mehrschichtiges Epithel (Drenckhahn, 1994). Verschiedene Autoren rechnen das Harnblasenepithel zur Gruppe der mehrreihigen Epithelien (Leonhardt, 1986). Eine allgemeingültige Klassifizierung ist bisher noch nicht erfolgt. Das Übergangsepithel besteht aus Basalzellen, Intermediärzellen und Deckzellen. Die zum Harnblasenlumen weisenden Deckzellen sind die größten Zellen dieses Epithels und besitzen stielartige basale Ausziehungen, die bis zur Basallamina herunterreichen können. Diese Eigenschaft wird als partielle Mehrreihigkeit beschrieben. Aufgrund der großen Füllungsunterschiede der Harnblase werden die Deckzellen temporär stark gedehnt und dabei abgeflacht. Die Deckzellen entwickeln sich aus den Basalzellen. Durch Teilung dieser oder Verschmelzung von zwei Zellen bilden sich über Intermediärzellen letztendlich die ausdifferenzierten Deckzellen. Diese Entwicklung ist in etwa elf Wochen abgeschlossen. Die Deckzelle kann sich im gedehnten Zustand über einer Fläche bis zu ca. 7500  $\mu\text{m}^2$  ausbreiten und hat dann einen Durchmesser von ca. 100  $\mu\text{m}$ . Aus autoradiographischen Untersuchungen ist bekannt, dass die Deckzellen eine durchschnittliche Lebensspanne von etwa 200 Tagen haben (Leonhardt, H., 1990).

Die apikale Zellmembran der Deckzellen ist potenziell aggressiven, zellschädigenden Substanzen aus dem Urin ausgesetzt. Der Schutz tieferliegender Zell- und Gewebsschichten wird durch die zwischen den Deckzellen sehr gut ausgebildeten Zonulae occludentes gewährleistet. Eine parazelluläre Passage von Urin wird so verhindert. Die apikale Plasmamembran dieser Zellen weist darüber hinaus eine auffällige Modifikation auf, welche elektronenmikroskopisch als asymmetrische Plasmamembran imponiert. Die stärkere äußere Lamelle (8 nm statt normal 4 nm) ist die prominenteste Struktur in der Lipiddoppelschicht (Hicks, 1965 und Koss, 1969). Ein dichtes Netz von Intermediärfilamenten und Aktinfilamenten unterhalb der apikalen Membran ist für eine verstärkte Anfärbbarkeit des apikalen Zytoplasmasaums der Deckzellen verantwortlich. Dieser Bereich wurde früher als „Crusta“ bezeichnet und wird heute nicht mehr verwendet.



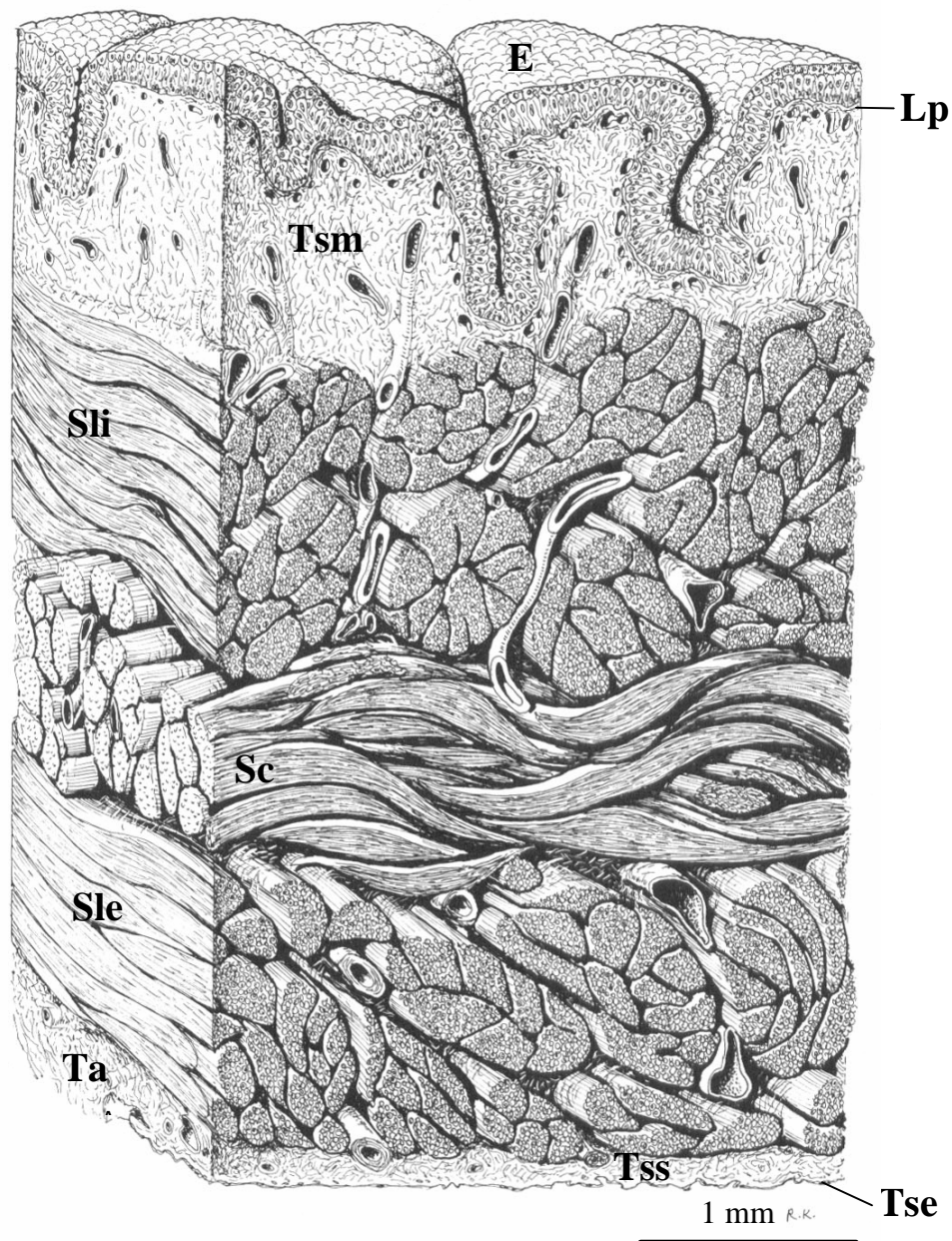


Abb. 1 Harnblase – Übersicht (mod. n. Krstić)

E Epithel (gefaltet)

Lp Lamina propria

Tsm Tela submucosa

Sli Stratum longitudinale internum

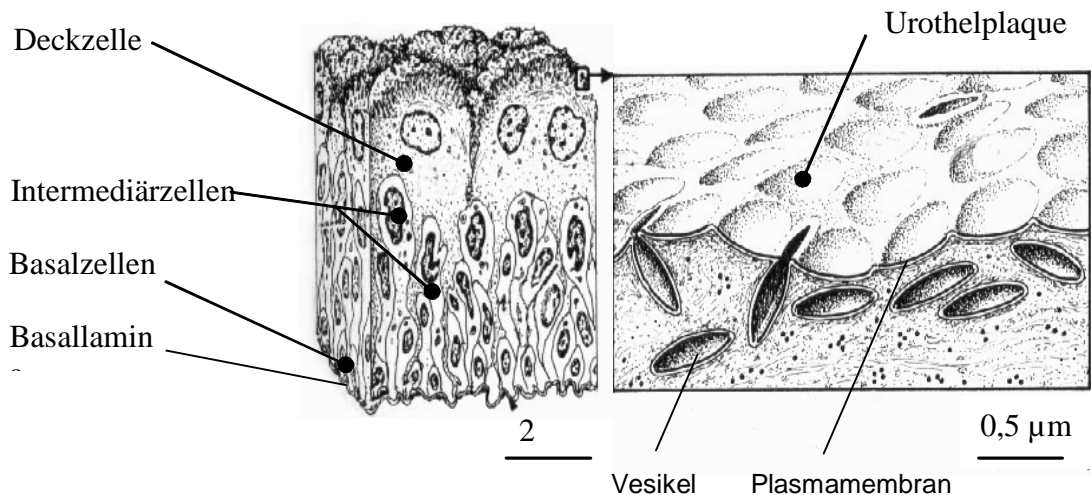
Sc Stratum circulare

Sle Stratum longitudinale externum

Tss Tela subserosa

Tse Tunica serosa

Ta Tunica adventitia (nur in retroperitonealen Organabschnitten)



Ab

b. 2 Harnblase – Urothel (mod. n. Krstić)

Die apikale Plasmamembran wird durch zahlreiche dichtgepackte Urothel-Plaques gebildet (Abb. 2). Diese enthalten in einer sehr hohen Konzentration Uroplakin als integrales Membranprotein. Bisher wurden drei Subtypen isoliert. Die Uroplakinmoleküle bilden hexagonale Strukturen aus, die anscheinend durch ihre symmetrische, fast parakristalline Anordnung den Plaques und damit auch der apikalen Membran der Deckzellen ihre Rigidität und hohe chemische Resistenz verleihen. Das asymmetrische Bild der Plasmamembran lässt sich der unterschiedlichen Verteilung des Uroplakins in der Membran zuschreiben, da die extrazelluläre Domäne des Uroplakins wesentlich größer ist als die intrazelluläre (Liang et al., 2001). Von den bisher bekannten Subtypen haben nur die Uroplakinsubtypen I und III zytoplasmatische Domänen (Wu und Sun, 1993). Neben dieser einzigartigen Modifikation der apikalen Plasmamembran weisen Deckzellen eine weitere Besonderheit auf. Intrazellulär befinden sich zahlreiche vesikuläre Strukturen mit einem teils fusiformen, teils diskoiden Aussehen. Diese können als eine Art apikale Reservemembran angesehen werden, da auch diese Vesikel den asymmetrischen Membranaufbau zeigen und aus Urothel-Plaques bestehen. Durch einen, in seinem Mechanismus noch nicht verstandenen Fusionsvorgang verschmelzen diese Vesikel mit der apikalen Membran und erlauben so möglicherweise eine schnelle Anpassung an eine vermehrte Blasenfüllung. Eventuell verlangt aber auch die Zusammensetzung des Urins mit einem sauren oder basischen pH-Wert eine beschleunigte Erneuerung von angegriffenen Membranabschnitten. Die asymmetrische Membran bildet somit



zusammen mit den Zonulae occludentes die effektive Blut–Urin–Schranke (Jezernik et al., 1993; Chang et al., 1994). Da es sich bei den Uroplakinen, insbesondere Uroplakin III, um spezifische, nur in Deckzellen des Urothels vorkommende Membranglykoproteine handelt, wird Uroplakin als morphologischer Tumormarker für metastasierende Urothelzellkarzinome eingesetzt (Moll et al., 1993). Die Identifizierung der Uroplakine findet darüber hinaus auch in der immunohistochemischen Differentialdiagnostik bei urothelialen Karzinomen Anwendung (Kaufmann et al., 2000).

Als weitere Besonderheit konnten spezifische Urothelzytokeratine identifiziert werden. Die für einschichtige Epithelien obligaten Zytokeratine 8 und 18 werden durch das Zytokeratin 20 (CK 20) ergänzt. Dieses charakterisiert die enddifferenzierten Deckzellen, während die Basal– und Intermediärzellen kein Zytokeratin 20 synthetisieren. Während der Differenzierung der Urothelzellen kommt es zu einem Wechsel der Synthese von CK 17 zu CK 20. Die enddifferenzierte Deckzelle enthält kein Zytokeratin 17 (CK 17) mehr.

Wie fast alle eukaryontischen Zellen besitzen die Deckzellen auch Aktinfilamente. Diesen kommt nach Untersuchungen von Romih et al. (1999) eine wichtige Funktion bei der Regeneration der Zellen zu. Nach Schäden der apikalen Membran konnte eine Ausrichtung von Aktinfilamenten längs zur luminalen Plasmamembran beobachtet werden. Dies führt zu einer Verstärkung der apikalen Membran. Diese zellspezifischen Beobachtungen führen zu einem einheitlichen Muster bei der Differenzierung dieser Zellen. Deshalb kann die subzelluläre Verteilung von Aktinfilamenten auch als Marker der urothelialen Differenzierung herangezogen werden (Romih et al., 1999).

## **2.3 Prinzipien der Membranfusionen**

In Epithelzellen stehen zwei Möglichkeiten einer polaren Verteilung der Membranproteine zur Verfügung (Caplan 1997). Ein vektorieller Transport, bei dem Membranproteine in trans–Golgi Netzwerke sortiert werden, um dann in Transportvesikeln zielgerichtet zur apikalen oder basolateralen Plasmamembran transportiert zu werden (Simons et al., 1990; Drubin et al., 1996). Die zweite Möglichkeit wird durch die transzytotische Steuerung beschrieben. Bei diesem

Transport werden Membranproteine nach dem Zufallsprinzip in die basolaterale oder apikale Plasmamembran eingebaut. „Falsch eingebaute“ Proteine werden als solche erkannt und durch den Prozess der Transzytose zur korrekten Membrandomäne oder zum lysosomalen Kompartiment transportiert (Drubin et al., 1996; Weimbs et al., 1997). Dabei ist es von Bedeutung, dass bei der Fusion von Vesikeln die Lumenseite der Vesikelmembran zur Außenseite der Plasmamembran wird. Dadurch befinden sich transmembranale Glykoproteine mit ihren Kohlenhydratgruppen auf der extrazellulären Seite der Membran. In den Deckzellen des Urothels kommt es zum exozytotischen Vesikeltransport. Die in Kap. 1.2 beschriebenen diskoiden Vesikel verschmelzen dabei mit der luminalen Plasmamembran, um so verbrauchte Membranbestandteile zu erneuern. Dazu werden Vesikelmembranen in die Plasmamembran eingebaut. Es handelt sich also um eine Fusion von Membranen. Fusionen zwischen Membranbestandteilen sind innerhalb von Zellen häufig zu beobachten. Es können entweder Membranen von unterschiedlichen Kompartimenten oder von nur einem Kompartiment beteiligt sein. Die Endozytose sowie die Exozytose sind durch die Verschmelzung von zwei Membranen gekennzeichnet. Die Membranfusionen können somit in beide Richtungen ablaufen. Die Internalisierung von Membranabschnitten wird als Vesikulation bezeichnet. Der entscheidende Punkt bei einer Fusion ist, die räumliche Annäherung getrennter Membranen. Bei dieser Annäherung müssen mechanische Zwänge durch die entgegengewirkenden Membranen überwunden werden. Hierbei wird, durch Konformationsänderungen der an diesem Prozess beteiligten Proteine, Energie verbraucht. Diese Energie muss zur Einleitung der eigentlichen Fusion durch energietragende Moleküle, zum Beispiel ATP, bereitgestellt werden.

## 2.4 Die SNARE-Hypothese

Die molekularen Mechanismen, die den Fusionsvorgängen zugrunde liegen, sind insbesondere an Hefezellen und Neuronen untersucht worden. In der von Rothman aufgestellten SNARE-Hypothese (Rothman, 1994) werden **SNAP-Rezeptor**-Proteine angenommen, die für die Membranfusionen erforderlich sind. Diese SNARE-Hypothese erlaubt es eine bestimmte Art von Fusionsvorgängen

zu beschreiben wie sie z.B. bei der exozytotischen Freisetzung von Neurotransmittern durch Fusion der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran vorkommt. Sie stellt mit der Assoziation verschiedener Membranproteine, sowie zytosolischer Proteine untereinander, als einleitender und wichtiger Schritt der nachfolgenden Membranfusion eine gute Modellvorstellung dar. Nach dieser Hypothese werden Proteinrezeptorpaare der Vesikel (**v**-SNARE-Proteine) und der Ziel-(**t**arget)membran (**t**-SNARE-Proteine) unterschieden. Die v-SNAREs umfassen die Familie der Synaptobrevine; sie werden auch als vesikel-assoziierte Membranproteine (**VAMPs**) bezeichnet. Die Familie der Syntaxine und SNAP 25 gehören zu den t-SNARE-Proteinen. Diese SNAP-Rezeptor-Proteine bilden miteinander einen initialen Haftkomplex aus. Dieser Komplex bildet sich nicht nur in vivo, sondern auch spontan in vitro und ist gegen starkes Erhitzen und SDS-Behandlung resistent (Söllner et al., 1993; Calakos et al., 1994). Neben den SNARE-Proteinen spielen nach dem Modell der SNARE-Hypothese auch die zytosolischen Proteine NSF (**N**-ethylamid-sensitive factor), eine ATPase, und die  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -SNAPs eine wichtige Rolle (Wilson et al., 1989). In vivo löst NSF als Chaperonemolekül den SNARE-Komplex. NSF selbst wird durch **SNAP** (soluble NSF attachment protein) an die Vesikelmembran gebunden. Mit der ATP-Hydrolyse durch NSF wird der SNARE-Komplex dissoziiert und damit die eigentliche Fusion der Lipidmembranen eingeleitet. In neueren kristallographischen Untersuchungen wurde bei den Syntaxinen die Aminosäure Glutamin (Q) und bei den Synaptobrevinen ein Arginin (R) an zentraler, funktionell bedeutender, Position lokalisiert (Jahn und Südhoff, 1999). Diese Beobachtung führte zu einer neuen Terminologie für die SNARE-Proteine. Danach werden die SNARE-Proteine, deren Mitglieder im Verteilungsmuster nicht streng nach Vesikel- und Zielfmembran getrennt werden können (Jahn et al., 1999), nach ihren molekularen Eigenschaften bezeichnet. Es werden Q-SNAREs und R-SNAREs unterschieden.

Neben den eigentlichen SNARE-Proteinen sind zahlreiche regulatorische Proteine beschrieben worden, die für die Fusionsvorgänge von Bedeutung sind. Kleine GTP bindende Proteine der Rab-Familie, die bei Säugern etwa 40 Formen umfasst, stellen eine Gruppe von Faktoren für den Fusionsprozess. Für die synaptische Vesikelfusion spielt Rab3A eine Rolle. Möglicherweise wirken Rab-

Proteine auch bei der Membranerkennung und der initialen Anheftung mit (Cao et al., 1998, Ungermann et al., 1998a). Eine abschließende Bedeutung der Rab-Proteine für den Fusionsprozess konnte bisher noch nicht gefunden werden (Chavrier et al., 1990; Rothman et al., 1997). Für weitere Proteine, wie den Munc 18-Isoformen, wurden ebenfalls regulatorische Funktionen beschrieben. Munc 18 bindet an Syntaxin. Dadurch wird die Komplexbildung mit SNAP 25 oder Synaptobrevin verhindert (Hata et al., 1993). In Neuronen begünstigt ein weiteres Regulatorprotein als Kalziumsensor den Übergang in den vollfusionierten Zustand der Membranen.

In den letzten Jahren hat es sich gezeigt, dass nicht nur in Neuronen und in Hefe, sondern auch in anderen Zellen Fusionsvorgänge nach einem vergleichbaren Muster ablaufen können.

In verschiedenen Epithelzellen konnten bereits Isoformen bestimmter SNARE-Proteine identifiziert werden. Beispiele hierfür sind die Hepatozyten der Leber (Fujita et al., 1998), die Parietalzellen des Magens (Jöns et al. 1999; Peng et al., 1997) oder die Sammelrohrzellen der Niere (Jo et al., 1995). SNAP 23, eine Isoform von SNAP 25, wurde in den Zellen von verschiedenen Geweben beschrieben (Ravichandran et al., 1996). Die eindeutige Zuordnung von SNAP 23 zu bestimmten Membrankompartimenten war bisher jedoch nicht möglich. In den Azinuszellen des Pankreas kommt SNAP 23 basolateral vor, in MDCK-Zellen hauptsächlich apikal (Low et al., 1998).

### **3 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Die epitheliale Auskleidung der harnableitenden Organe stellt ein hochspezialisiertes Epithel dar. Die Deckzellen des Urothels, die in direktem Kontakt mit dem unter Umständen auch zellschädigenden Urin stehen, verfügen über spezielle Schutzmechanismen, die ein Übertreten von Urin oder Urinbestandteilen verhindern. Neben gut ausgebildeten Zonulae occludentes besteht die apikale Plasmamembran aus dicht gepackten Urothelplaques. Diese gewährleisten durch einen streng geordneten Uroplakineinbau in die Plasmamembran den zellulären Schutz. Durch Fusionsereignisse findet eine permanente Erneuerung von apikaler Plasmamembran mit Urothelplaques statt. Der Mechanismus dieser Fusion zwischen den intrazellulären Vesikeln mit der apikalen Zellmembran war nicht bekannt. Untersuchungen zu diesem Thema sind der zentrale Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Ausgehend von Befunden die zeigten, dass in verschiedenen anderen Epithelzellen die Fusion intrazellulärer Vesikel mit der Zellmembran an das Vorhandensein von SNARE-Proteinen geknüpft ist, sollte versucht werden, im Urothel der Harnblase der Ratte SNARE-Proteine zu identifizieren und deren Bedeutung für die Fusionsvorgänge im Urothel zu charakterisieren. Darüber hinaus wurde untersucht, über welchen zellulären Mechanismus ein Gleichgewicht zwischen dem Neueinbau und einer Wiederaufnahme oder Abgabe von Membranbestandteilen gewährleistet wird. Es sollte demnach überprüft werden, ob es zu einer mit den Fusionsereignissen gleichgeschalteten Endozytose oder zu einem Abknospen von Zellmembranbestandteilen kommt.

Diese Fragestellungen sollten mittels proteinbiochemischen sowie licht- und elektronenmikroskopischen Methoden bearbeitet werden.

Des Weiteren sollte ein Beitrag zur Einordnung des Urothels in die Klassifikation der Epithelien geleistet werden. Das Ziel der Arbeit war es, eine Aussage zur Zugehörigkeit des Urothels zu den mehrreihigen bzw. den mehrschichtigen Epithelien zu treffen.

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Chemikalien und Reagenzien

#### Reagenz

#### Hersteller

Aceton	Herbeta (Berlin)
Acrylamid Stammlösung (30%)	Roth (Karlsruhe)
Äther zur Narkose	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Merck (Darmstadt)
Albumin Rinderserum (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Alkohol (unvergällt)	Merck (Darmstadt)
Ammoniumpersulfat	Sigma (München)
Ammoniumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Araldit	Serva (Heidelberg)
Bisacrylamid Stammlösung (30%)	Roth (Karlsruhe)
Bleinitrat	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Sigma (München)
Chloronaphtol	Bio – Rad (Hercules, CA, USA)
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma (München)
Dimethyl–Sulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe)
Dithioeritherol (DTE)	Roth (Karlsruhe)
DNase I aus Rinderpankreas	Roche (Mannheim)
Dodecylbernsteinsäureanhydrid	Fluka (Neu – Ulm)
ECL <sup>™</sup> (Enhanced Chemiluminescence)	Amersham (Buckinghamshire, GB)

Epon	Fluka (Neu – Ulm)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Ethylenglykol, bis(2-aminoethyl)tetraacetsäure (EGTA)	Roth (Karlsruhe)
Formvar (0,3 % in 1,2-Dichlorethan)	Serva (Heidelberg)
Glutaraldehyd	Fluka (Neu – Ulm)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Hybond C (Nitrozellulose)	Amersham (Buckinghamshire, GB)
Imidazol	Sigma (München)
Low Molecular Weight Marker (LMW)	Pharmacia Biotech (Uppsala, S)
Magermilchpulver	Glücksklee (München)
Metaperjodat	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
2-Methylbutan	Roth (Karlsruhe)
Mowiol	Hoechst (Frankfurt a. M.)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (Darmstadt)
Natriumcitrat	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Boehringer Mannheim
Natrium-Methylat	Fluka (Neu – Ulm)
Natriumtetraborat	Merck (Darmstadt)
Nitrozellulose	Schleicher & Schuell (Kassel)
Nonidet <sup>®</sup> 40	Fluka (Neu – Ulm)

Osmiumtetroxid	Merck (Darmstadt)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt)
Perjodsäure	Merck (Darmstadt)
Pikrinsäure	Odczyniki Chemiczne (Gliwice, P)
Polyethylenglykol 20.000	Roth (Karlsruhe)
Ponceau S	Sigma (St. Louis, USA)
Propylenoxid	Serva (Heidelberg)
Proteinase Inhibitoren:	
Aprotinin	Boehringer Mannheim
Leupeptin	Boehringer Mannheim
Pepstatin	Boehringer Mannheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth (Karlsruhe)
Protein A [ <i>aus Staph. aureus</i> ] Sepharose	Pharmacia Biotech (Uppsala, S)
Sucrose	Merck (Darmstadt)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma (München)
Toluidin Blau	Merck (Darmstadt)
Toluol	Merck (Darmstadt)
Trisdimethylaminomethylphenol	Fluka (Neu – Ulm)
Triton X–100	Roth (Karlsruhe)
Tween 20	Merck (Darmstadt)
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck (Darmstadt)
Ziegenserum (NGS)	Pan–Systems (Aidenbach)



## 4.2 Puffer und Lösungen

Antikörper-Lösung für Immunofluoreszenzmikroskopie

1,5 % Rinderserum Albumin in PBS

Antikörper- / Block-Lösung für Immunogoldmarkierung

140 mM	NaCl	
5 mM	Tris	pH 7,6 (HCl)
1 l	Aqua dest.	
1 %	NGS	
1 %	BSA	
0,1 %	Triton X-100	

Antikörper-Lösung für Immunogoldmarkierung

140 mM	NaCl	
5 mM	Tris	pH 8,2 (HCl)
1 l	Aqua dest.	
0,1 %	Triton X-100	

Antikörper- / Block-Lösung für Westernblot-Analysen

10 % Magermilchpuffer in PBS

Block-Lösung für Immunofluoreszenz

2 % BSA in PBS

Fixationspuffer für Elektronenmikroskopie

4 %	PFA	pH 7,4 mit Phosphat abgepuffert
0,2 %	Pikrinsäure	
0,05 %	Glutaraldehyd	

Immunopräzipitationspuffer

150 mM	NaCl	
10 mM	Tris	pH 7,4
1 mM	EDTA	

1 mM	EGTA
0,2 mM	Na – Vanadat
0,2 mM	PMSF
1 %	Triton X 100
0,5 %	Nonidet <sup>®</sup> P40

#### Kontrastierungslösung nach Reynolds<sup>®</sup>

120 mM	Natriumcitrat	
80 mM	Bleinitrat	
8 ml	1N Natronlauge	pH 12.0
auf 50 ml	Aqua dest	

#### Phosphatpuffer (PBS)

140 mM	NaCl
10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2,7 mM	KCl
1,8 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

#### Ponceau–S Lösung

0,5 %	Ponceau S
3 %	Trichloressigsäure

#### Präparationspuffer für Membranpräparation

250 mM	Sucrose	ph 7,3
10 mM	DTE	
5 mM	Imidazol	
5 mM	EDTA	
1 µg/ml	Aprotinin	
1 µg/ml	Pepstatin	
1 µg/ml	Leupeptin	
1 µmol/ml	PMSF	
1 Spsp	DNase	

#### Probenpuffer (3x)

4 M	Glycerin	
200 mM	SDS in Aqua dest.	
180 mM	Tris	pH 6,9 (HCl)
12 M	DTE	
800 µl	Bromphenolblau (6 M)	
ad 40 ml Aqua dest.		

#### Sammelgel-Puffer (4x)

500 M	Tris	pH 6,8
15 mM	SDS	
ad 1 Liter Aqua dest.		

#### Spüllösung für Westernblot-Analysen

0,1 % Tween 20 in PBS

#### Transblotpuffer (Semi Dry)

192 mM	Glycin	
25 mM	Tris	pH 8,3
20 %	Methanol	

#### Tris I

500 mM	Tris	pH 6,8 (HCl)
0,4 %	SDS	

#### Tris II

1,5 M	Tris	pH 8,8 (HCl)
0,4 %	SDS	

#### Toluidinfärbelösung

1,2 M	Sucrose	
100 ml	Aqua dest.	pH 9,3
25 mM	di-Natriumtetraborat	
15 mM	Toluidinblau	

#### Trenngel-Puffer (4x)

1	M	Glycin	
120	mM	Tris	pH 8,8
20	mM	SDS	
auf 1 Liter Aqua dest.			

### 4.3 Verwendete Antikörper

#### Primäre Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle und Referenz
$\alpha$ - Actin (Klon 1A4) monoklonal, Maus	Sigma, St. Louis, USA Skalli et al. (1986)
Zytokeratin 17 (Klon E3) monoklonal, Maus	Dako, Glostrup, Dänemark Moll et al. (1982)
Zytokeratin 20 (Klon K <sub>s</sub> 20.8) monoklonal, Maus	Dako, Glostrup, Dänemark Moll et al. (1990)
SNAP 25 (Klon SMI 81) monoklonal, Maus	Sternberger Monoclonals, Baltimore, USA Mehta et al. (1996)
SNAP 23 polyklonal, Kaninchenserum	Synaptic Systems, Göttingen Südhof et al. (1995)
alpha - SNAP monoklonal, Maus	Synaptic Systems, Göttingen Rothman, J. E. (1994)
Synaptobrevin II polyklonal, Kaninchen	R. Jahn, Göttingen Edelmann et al. (1995)
Synaptobrevin II (Klon 69.1) monoklonal, Maus	Synaptic Systems, Göttingen Edelmann et al. (1995)
Syntaxin (Klon HPC-1) monoklonal, Maus	Sigma, St. Louis, USA Barnstable et al. (1985)
NSF polyklonal, Kaninchen	Synaptic Systems, Göttingen Südhof, T. C. (1995)
Uroplakin (Klon AU1) monoklonal, Maus	ProGen, Heidelberg Wu et al. (1993)

Die gegen die verschiedenen Zytokeratine eingesetzten Antikörper sind nach Moll et al. (1982) klassifiziert. Die Zytokeratine 17 und 20 haben beide eine Größe von 46 kDa und sind in verschiedenen Epithelzellen beschrieben worden (Moll et al., 1982 und 1990).

Actin ist ein ubiquitäres Protein, welches in fast allen Zellen exprimiert wird.

Verschiedene Actinisoformen sind beschrieben worden. Der hier eingesetzte Antikörper ist gegen  $\alpha$ -Actin, die Isoform der glatten Muskulatur, gerichtet (Skalli et al., 1986).

Gegen SNAP 25 wurde ein monoklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des Peptids eingesetzt. Dieser Antikörper ist in synapsenreichen Gebieten des Gehirns und der Retina spezifiziert (Mehta et al., 1996).

Die Detektion des R-SNARE-Proteins Synaptobrevin war durch das polyklonale Antiserum möglich. Für die ultrastrukturellen Untersuchungen wurde ein monoklonaler Antikörper eingesetzt. Es handelt sich hierbei um ein spezifisches Antiserum gegen das Synaptobrevin II. Das Molekulargewicht liegt für Synaptobrevin II bei 18 kDa (Edelmann et al., 1995).

Für Syntaxin, als Q-SNARE-Protein, wurde der Antikörperklon HPC-1, gerichtet gegen die extrazelluläre Domäne des Proteins, eingesetzt. Syntaxin hat ein Molekulargewicht von 35 kDa und wurde überwiegend in neuronalen Geweben spezifiziert (Barnstable et al., 1988).

Der Klon AU1 ist gegen Uroplakin III gerichtet. Uroplakin ist ein urothelspezifisches Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 47 kDa im Urothel. Nach Deglykosilierung wird in der Westernblotanalyse eine zusätzliche Proteinbande von 30 kDa gefunden (Wu und Sun, 1993). Die Hybridkultur wird als immunhistologischer Marker, zur Differenzierung verschiedener Karzinome, in der Pathologie eingesetzt (Kaufmann et al. 2000).

## Sekundäre Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Pferd anti – Maus IgG Peroxidase gekoppelt	Vector Laboratories, Burlingham, USA
Ziege anti – Kaninchen IgG Peroxidase gekoppelt	Vector Laboratories, Burlingham, USA
Esel anti – Maus IgG Texas Red™ gekoppelt	Jackson Laboratories, West Grove, USA
Ziege anti – Kaninchen IgG Texas Red™ gekoppelt	Jackson Laboratories, West Grove, USA
Ziege anti – Kaninchen IgG Oregon Green™ gekoppelt	Molecular Probes, Eugene, USA
Ziege anti – Kaninchen IgG	Amersham, Uppsala, Schweden

5 nm Gold gekoppelt	
Ziege anti – Maus IgG 10 nm Gold gekoppelt	Aurion, AA Wageningen, Niederlande

## 4.4 Verwendete Geräte

### Zentrifugen

Beckmann Optima™ TL Rotor: TLA 100.4 (Palo Alto, USA)

Ultrazentrifuge

Beckmann J2 – HS Rotor: JA 14, JA 20 (Palo Alto, USA)

Eppendorf Zentrifuge 5402 (Hamburg)

### Elektrophorese

Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad)

Power Pac 200 Netzgerät (Bio-Rad)

Mini-Protean® II Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad)

### Mikroskopie

Gefriertrockner Edwards (Crawley, UK)

Ultramikrotom Leica (Bensheim)

Epifluoreszenz-Mikroskop mit Durchlichteinrichtung Leica DMLB (Wetzlar)

Digitalkamera SPOT INTAS (Göttingen)

Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM 900 (Oberkochen)

## 4.5 Durchführung der Experimente

### 4.5.1 Membranpräparation des Harnblasenepithels

Zur Herstellung der Membransuspension für die Westernblotanalyse wurden Harn-

blasen adulter Ratten verwendet. Es wurden ausschließlich adulte Wistar–Ratten beider Geschlechter verwendet. Die Tiere wurden nach tiefer Äthernarkose dekapitiert. Nach Freipräparieren der Harnblase wurde das Gewebe schnell extrahiert und anschließend mit 4°C–kaltem Präparationspuffer gespült. Zur Epithelgewinnung wurde die luminale Harnblasenwand mit Präparationspuffer mit enthaltenen Proteaseinhibitoren beträufelt und mit einem Skalpells vorsichtig abgeschabt. Die Zellsuspension wurde mit dem Präparationspuffer auf 3 ml aufgefüllt und mit dem Glas–Teflon–Homogenisator homogenisiert. Zur Weiterverarbeitung wurde das Homogenat 10 min mit 1'200 g in der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Das so erhaltene Sediment enthält Zellkerne und nichtlysierte Zellen sowie größere Zelltrümmer. Der Überstand wurde bei 150'000 g in der Ultrazentrifuge von Beckmann 30 min zentrifugiert. Danach konnte der Überstand dekantiert und die sedimentierten Membranen in Probenpuffer für die Elektrophorese aufgenommen werden. Alle Schritte erfolgten bei 4 °C.

#### 4.5.2 Protein–Gelelektrophorese und Westernblot–Analyse

Die Proteinsuspensionen wurden in der SDS–Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (mod. n. Laemmli). Die in Probenpuffer aufgenommenen Proteinsuspensionen wurden vor dem Auftragen für 10 min, bei 95 °C erhitzt. Die Auftrennung erfolgte, wenn nicht anders aufgeführt, mit 12 % Gelen. Als Marker diente ein kommerzieller Standard (LMW) mit Proteinbanden von 14.4 kDa bis 94 kDa. Das Gel war wie folgt zusammengesetzt:

	<u>Trenngel 12%</u>		<u>Sammelgel 3%</u>	
	Tris II	2000 µl	Tris I	500 µl
Acrylamid Stock 30%		3200 µl		200 µl
Bisacrylamid Stock 30%		1280 µl		80 µl
H <sub>2</sub> O		1520 µl		1220 µl
Temed		10 µl		2,6 µl
10% APS		80 µl		20 µl

Die Proteine wurden nach der Auftrennung im SDS–Gel bei 0,3 A / Gel 20 min auf Hybond C Nitrozellulosemembran im Sandwichverfahren elektrotransferiert. Dazu

wurde das Trans-Blot<sup>®</sup> SD Semi-Dry Transfer Cell System (Bio-Rad) benutzt. Zur Optimierung des Proteintransfers wurde die Nitrozellulosemembran und das Filterpapier in Transblotpuffer 20 min inkubiert.

Zur reversiblen Visualisierung der aufgetrennten Proteine wurde die Nitrozellulosemembran in Panceau-S Lösung 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Aqua dest. gespült. Danach konnte die Nitrozellulose entsprechend der Marker beschriftet und geschnitten werden. Zur Suppression unspezifischer Proteinbindungsstellen (Johnson et al., 1984) wurden die Nitrocellulosestreifen 1 h in Blocklösung inkubiert.

Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei 4 °C. Der entsprechende sekundäre Antikörper wurde 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jeder Inkubation wurden die Nitrozellulosestreifen 3 x 15 min in Spüllösung gewaschen. Alle Inkubationen und Waschschrte erfolgten auf einem Schüttler bei 150 rpm.

Die Visualisierung der antikörpermarkierten Proteinbanden erfolgte über Lumineszenz. Dazu wurde das ECL<sup>™</sup>-Westernblot Analysesystem von Amersham benutzt.

#### **4.5.3 Immunopräzipitation**

Zur Analyse der verschiedenen Protein-Proteininteraktionen wurden Immunopräzipitationen durchgeführt. Zu einem ml Membransuspension [beschrieben unter 4.5.1] mit ca. 200 µg Protein in 100 µl Präzipitationspuffer wurden 3 µl eines polyklonalen SNAP 23 Antiserums gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde 30 µl Protein A-Sepharose (50%) zur Lösung gegeben und für weitere 4 h auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Nach dreimaliger Waschzentrifugation mit Immunopräzipitationspuffer wurde die Protein A-Sepharose in Probenpuffer resuspendiert und für 10 min aufgekocht (Anderson et al., 1981). Danach erfolgte die elektrophoretische Auftrennung und der Elektrotransfer auf Nitrozellulose. Die Detektion der im Komplex gebundenen Proteine erfolgte durch Antikörperinkubation und ECL<sup>™</sup>-Visualisierung.

Parallel dazu wurde eine Immunopräzipitation mit SNAP 25 Antiserum durchgeführt.



#### **4.5.4 Proteinfällung**

Zur Gewinnung von Protein aus humanem physiologischen Urin wurden 800 ml Urin in Dialysierschläuche Visking 20/32 (Roth, Karlsruhe) über Nacht gegen Aqua dest. dialysiert. Anschließend wurde das Dialysat unter Polyethylglykol auf ca. 30 ml eingeeengt. Es erfolgte die Zugabe von gekühlter gesättigter Ammoniumsulfatlösung unter Rotation auf dem Magnetprüher mit Inkubation über Nacht. Es erfolgte eine Zentrifugation von 40'000 g über 60 min. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in Probenpuffer resuspendiert. Es wurde eine elektrophoretische Auftrennung mit anschließender Westernblotanalyse [beschrieben unter 4.5.2] durchgeführt. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C.

#### **4.5.5 Urinzentrifugation**

Für die Zentrifugation von physiologischem Urin wurden 2 l Urin eines gesunden Probanden über 12 h gesammelt. Die Zentrifugation von 8 x 250 ml Urin erfolgte bei 3'000 g über jeweils 30 min. Der Urinüberstand wurde dekantiert und für die weiteren Zentrifugationsschritte kühl gelagert. Die Sedimentpellets wurden mit Urin resuspendiert, in einem Gefäß gesammelt und erneut bei 3'000 g zentrifugiert. Nach Beendigung dieser Zentrifugation wurden die Pellets in Probenpuffer überführt und resuspendiert. Der dekantierte Urinüberstand wurde anschließend bei 5'000 g, 10'000 g, 200'000 g und 540'000 g zentrifugiert und die Pellets in Probenpuffer resuspendiert.

Die elektrophoretische Auftrennung und der Elektrotransfer erfolgte wie unter 4.5.2 beschrieben.

Zur elektronenmikroskopischen Betrachtung wurde 1,5 l humaner Urin verwendet. Die Zentrifugation erfolgte bei 30'000 g. Das Pellet wurde in Präparationspuffer aufgenommen und für die Elektronenmikroskopie aufbereitet [siehe 4.5.7]. Alle Zentrifugationschritte erfolgten bei 4 °C.

#### **4.5.6 Indirekte Immunofluoreszenzmikroskopie**

Nach Entnahme der Harnblase [beschrieben unter 4.5.1] wurden Gewebeblöckchen von 1 – 2 mm<sup>3</sup> in schmelzendem Methylbutan unter N<sub>2</sub>-Kühlung schnell eingefroren. Nach Gefriertrocknung über 48 h wurden die Gewebeproben unter Vakuum in Epon eingebettet (Drenckhahn et al., 1984). Von dem eingebetteten Gewebe wurden 1 µm Semidünnschnitte angefertigt. Für die Antikörperinkubation wurden die Schnitte in Na-Methanolat 6 min, in 1:1 Methanol-Toluol Gemisch 5 min, in Aceton 2 x 5 min, in Aqua dest. 5 min und in PBS 5 min inkubiert und aus dem Epon herausgelöst. So wurde die Zugänglichkeit der Antikörper zu den Epitopen der Proteine ermöglicht. Anschließend wurden die Schnitte in Blocklösung zur Suppression unspezifischer Bindungsstellen 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C. Danach wurde 3 x 5 min mit PBS gespült. Es folgte die Inkubation des jeweiligen mit Fluorochromen markierten Sekundärantikörpers und eine abschließende Spülung 3 x 5 min mit PBS. Alle Inkubationen und Waschschrte erfolgten in einem dunklen, feuchten Inkubator. Die Schnitte wurden anschließend mit Mowiol und Deckgläschen abgeschlossen. Die Methode der indirekten Immunofluoreszenz ermöglicht eine Signalverstärkung durch die mehrfache Bindung der sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper an den Primärantikörper.

Die eingesetzten sekundären Antikörper emittieren bei einer Erregerstrahlung von 596 nm Licht roter Wellenlänge [Texas Red™] bzw. bei einer Bestrahlung von 488 nm grünes Licht [Oregon Green™].

#### **4.5.7 Elektronenmikroskopie**

Es wurden, wie unter 4.5.6 beschrieben, kleine Gewebeblöckchen von ca. 2 mm<sup>3</sup> aus der Rattenharnblase gewonnen und in Fixationspuffer über 2 h auf Eis schüttelnd fixiert. Die fixierten Gewebestückchen wurden dann 4 x mit PBS jeweils 15 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gespült. Anschließend erfolgte die Kontrastierung mit Osmiumtetroxid 30 min. Durch Inkubation mit 4% Osmiumtetroxid werden Doppelbindungen oxidiert. Das entstehende reduzierte Osmiumdioxid ist wasserunlöslich und fällt kontrastgebend aus.

Danach wurde mit PBS 2 x 30 min gespült. Die Gewebestückchen wurden über Nacht in 70 % Alkohol bei 4 °C aufbewahrt. Da das Hochvakuum des Elektronenmikroskops ein absolut wasserfreies Präparat erfordert, erfolgte eine alkoholische Entwässerungsreihe (90 %, 96 %, 100 % jeweils 2 x 30 min). Zusätzlich wurde das Gewebe 2 x 10 min in 100 % Propylenoxid inkubiert. Zur Einbettung in Araldite wurden die Gewebestückchen in einem Araldite / DDSA / Propylenoxid-Gemisch und Beschleuniger (DMP-30) (mod. n. Meyer et al., 1991) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Durch eine vertikale Rotation bei ca. 60 Upm wurde eine homogene Durchmischung der Gewebestückchen erreicht. Am nächsten Tag wurden die Gewebestückchen im 1:1-Gemisch Araldite / DDSA mit Beschleuniger (mod. n. Meyer et al., 1991) 1 h bei 60 upm vertikal rotiert und anschließend bei Raumtemperatur in Gelatinekapseln überführt. Zur Entlüftung wurden die Kapseln für 1 h bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Polymerisation erfolgte bei 65 °C.

Von dem eingebetteten Gewebe wurden Ultradünnschnitte von 60 nm Dicke gefertigt. Zur besseren Haftung der Schnitte wurden die Präparatehalter mit einem Formvarfilm beschichtet, was zu einer planen Unterlage für die Schnitte führt. Die Ultradünnschnitte können durch diese Beschichtung nicht durch das Gitter der Nickelpräparatehalter (Roth, Karlsruhe) gelangen, sondern liegen dem Film dicht auf. Nach Befeuchtung mit Aqua dest. wurden die Schnitte jeweils für 7 min in 1 % Perjodat und 1 % Natriummetaperjodat angeätzt und mit der "post-embedding-Methode" nach Wenzel et al. (1997) weiterbehandelt. Verwendet wurden die Antikörper gegen Uroplakin III, Synaptobrevin, Syntaxin, SNAP 23. Als sekundäre Antikörper wurden 5 nm goldgekoppelte Antikörper anti-Kaninchen IgG und 10 nm Gold gekoppelte Antikörper anti-Maus IgG eingesetzt. Für Kontrollinkubationen wurde ein Präimmunserum verwendet.

Zur Positivkontrastierung, bei der durch spezifische Anlagerung von Schwermetallsalzen an Proteinen oder Nukleinsäuren biologische Strukturen dunkel erscheinen, wurden die Präparate jeweils 10 min mit Uranylacetat und Bleinitrat (Reynolds®) behandelt und abschließend mit Aqua dest. gespült. Sämtliche Lösungen wurden, um eine Verschmutzung der Präparate zu verhindern, durch einen 30 µm Filter gefiltert. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Die Betrachtung der Präparate wurden am Elektronenmikroskop EM 900 (Zeiss) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV durchgeführt. Die belichteten Filme wurden vom institutseigenen Fotolabor entwickelt.

#### **4.6 Statistische Methoden**

Die goldmarkierten Ultradünnschnitte wurden fotografiert und die Au-Signale standardisiert ausgezählt. Zur Auszählung wurden für jedes immunologisch detektierte Protein 20 Fotografien (25 x 32 cm) des Gewebeschnittes herangezogen. Die untersuchte Fläche betrug somit ca. 400  $\mu\text{m}^2$  Zellfläche für jedes untersuchte Protein.

Zur Kontrolle wurden Inkubationen mit Nonimmunserum durchgeführt und in gleicher Weise statistisch ausgewertet und den zu untersuchenden Auszählungen gegenübergestellt.

Die statistischen Berechnungen der vorliegenden Daten wurde durch das Computerprogramm Statistik Programm System SPSS<sup>®</sup> (V 10.0) im biomedizinischen Institut der Charité unterstützt und in Box-Plots dargestellt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Morphologie

Durch die Einbettungsmethode nach Gefriertrocknung mit Epon konnte eine gute Gewebeerhaltung erreicht werden. Der mittels Toluidinblau gefärbte Semidünnschnitt (Abb. 3) erlaubt eine sehr gute Beschreibung der lichtmikroskopischen Strukturen des Urothels. Die Tunica mucosa ist als deutliche Struktur erhalten. Die dem Lumen zugewandten Deckzellen sind angefärbt und lassen eine Zuordnung von Zellgrenzen und Zellkern zu. Die verstärkte apikale Anfärbung der Deckzellen wurde historisch als „Crusta“ bezeichnet. Sie ist auf ein dichtes Netz von Intermediär- und Aktinfilamenten zurückzuführen.

Ein Kontakt der Deckzellen mit der Basalmembran konnte in der hier vorliegenden Histologie in keinem Schnitt beobachtet werden. Da die Schnitte sehr dünn sind und so eine kontinuierliche Membranverbindung von luminal bis in die basalen Ausziehungen nicht verfolgt werden konnte, lässt sich eine eindeutige Zuordnung zu den mehrschichtigen Epithelien nicht beweisen. Daher kann die angloamerikanische Bezeichnung „umbrella cells“, die aufgrund des basalen Kontaktes der Deckzelle mit der Lamina propria entstanden ist, ebenfalls nicht gezeigt werden. Die Bezeichnung „Deckzelle“ scheint die idealste Bezeichnung der luminalen Zellen des Urothels zu sein.

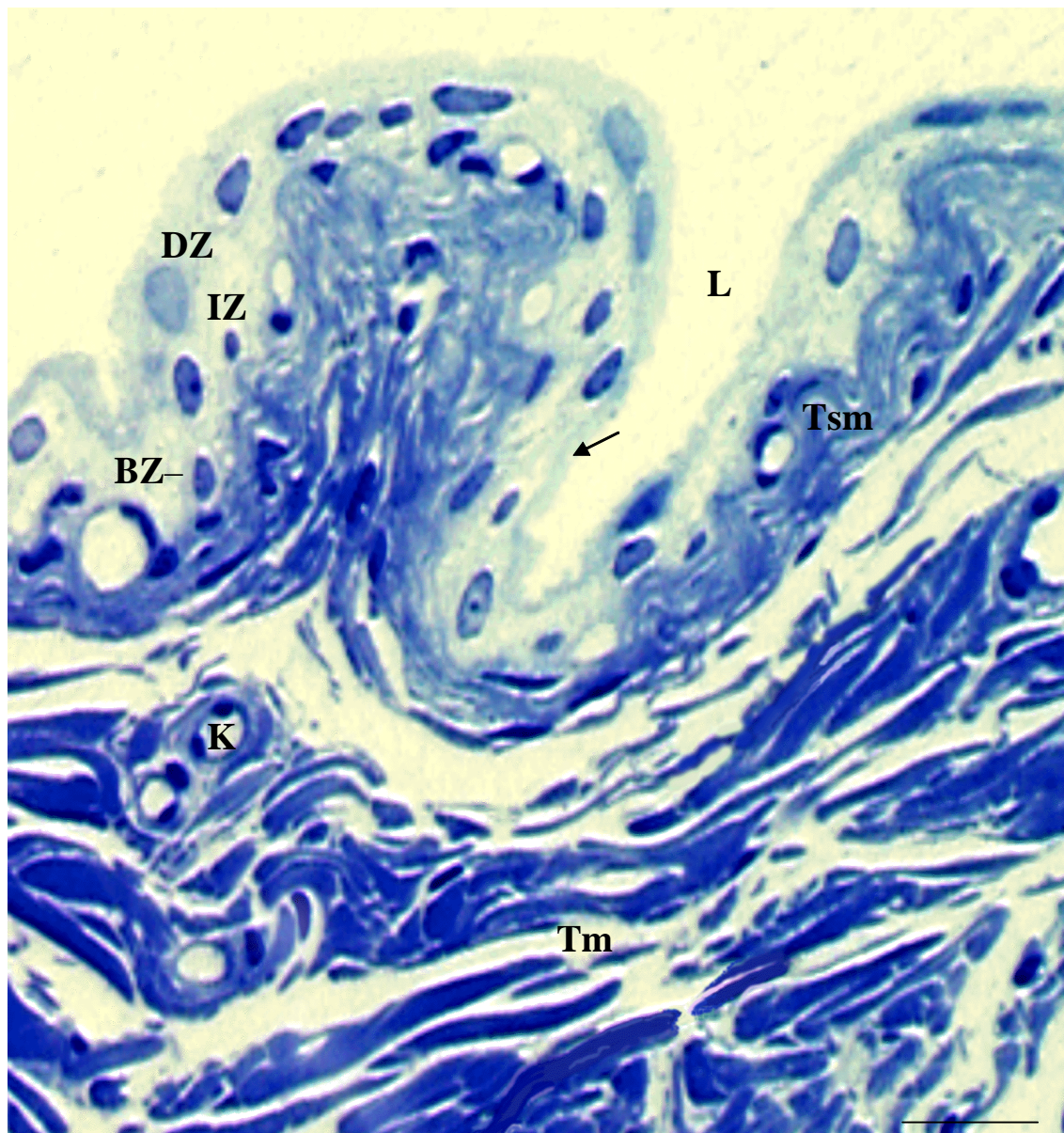
In der Immunofluoreszenz mit einem Antikörper gegen Uroplakin III konnten Deckzellen spezifisch markiert werden (Abb. 4 und 5). Das apikale Membrankompartiment, bestehend aus der apikalen Plasmamembran und den diskoiden und fusiformen Vesikeln, wird durch die Verstärkung des Fluoreszenzsignals am apikalen Zellpol gezeigt. Dieses Fluoreszenzsignal bleibt auf die luminale Zellreihe beschränkt und kann als Kontrollmarkierung der Deckzellen eingesetzt werden.

Da Uroplakin III fast ausschließlich in enddifferenzierten Deckzellen lokalisiert ist (Sun und Wu, 1993), wurde Uroplakin III in den gezeigten Bildern als spezifischer Marker für die Enddifferenzierung der Zellen eingesetzt.

Als weiteres Markerprotein der enddifferenzierten Deckzelle kann Zytokeratin 20 gezeigt werden (Romih et al., 1998). Basal- oder Intermediärzellen sind dagegen

Zytokeratin 20–negativ. Zytokeratin 20 wird sowohl in gesunden, als auch in karzinomatös entarteten Deckzellen exprimiert und zeigt ein deutliches subzelluläres Verteilungsmuster (Abb. 6). In der Immunofluoreszenzmikroskopie zeigt sich ein starkes apikales Signal, welches bis basolateral reicht. Aufgrund dieser Verteilung stellt Zytokeratin 20 ein wichtiges Strukturelement im Aufbau des Zytoskeletts dieser Zellen dar.





DZ	Deckzelle	Tm	Tunica muscularis	IZ	Intermediärzelle	K	Kapillare
BZ	Basalzelle	L	Lumen der Harnblase	Tsm	Tunica submucosa	Bar 10 µm	

Abb. 3 Semidünnschnitt (1 µm) der Harnblase einer Ratte nach Gefriertrocknung und Einbettung. Toluidinblau gefärbt. Die starke Fältelung der Harnblasenwand lässt auf eine entleerte Harnblase schließen. Die Deckzellen liegen als superfizielle Zellschicht den Intermediärzellen an und bilden die luminalen Abdichtung des Epithels. Es fällt eine deutliche Anfärbung im Bereich des luminalen Kompartiments (Pfeil) auf. Diese Struktur wurde als „Crusta“ bezeichnet. Nähere Erläuterungen im Text.

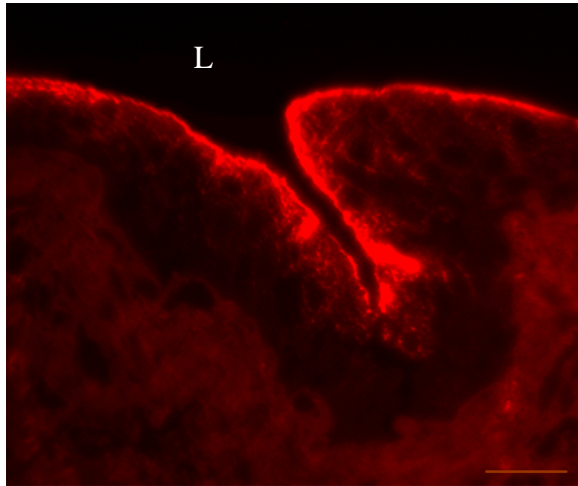


Abb. 4

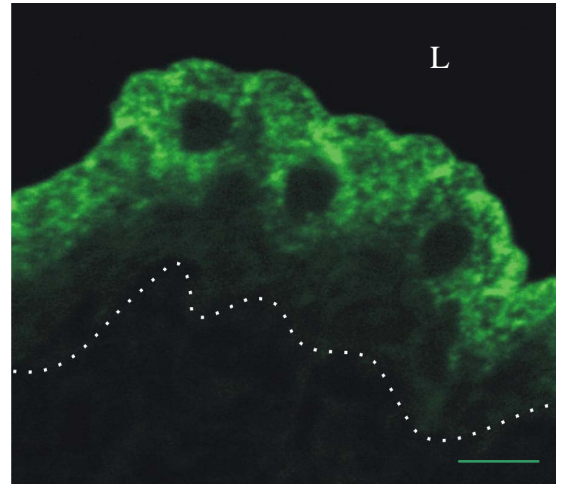


Abb. 5

Abb. 4 + 5 Semidünnschnitte (1  $\mu\text{m}$ ) der Harnblase der Ratte. Lokalisation von Uroplakin III in Deckzellen des Urothels durch Immunofluoreszenz. Punktlinie in Abb. 5 markiert die basale Zellgrenze. Uroplakin wird vermehrt im apikalen Zellpol exprimiert und dann in die Plasmamembran eingebaut (Abb. 4)

L = Lumen; Bar 10  $\mu\text{m}$

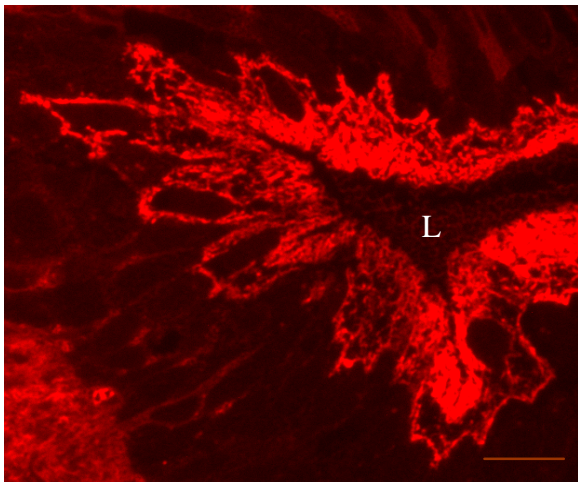


Abb. 6 Lokalisation von Zytokeratin 20 in Deckzellen im Urothel der Ratte. Neben anderen Zytokeratinen (CK 8, 18) wird als wichtiges Protein des Zytoskeletts Zytokeratin 20 nur in den Deckzellen exprimiert und kann als Marker für die enddifferenzierte Deckzelle dienen.

L = Lumen; Bar 10  $\mu\text{m}$

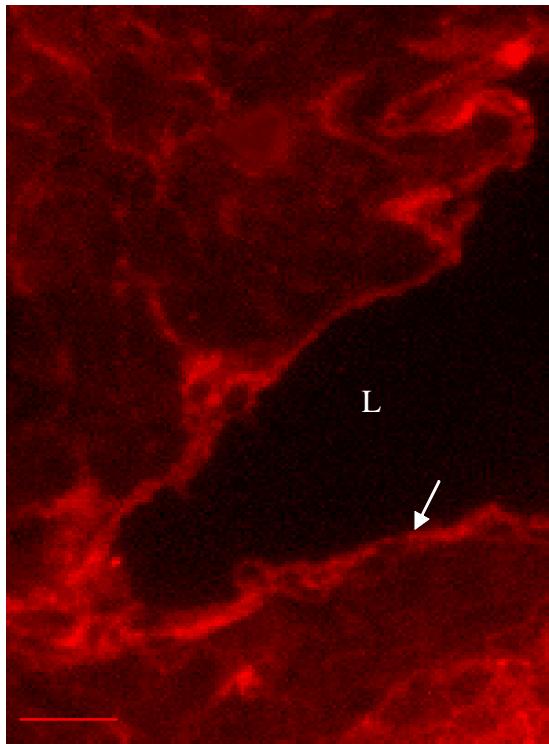


## **5.2 Detektion von SNARE-Proteinen im Urothel der Rattenharnblase**

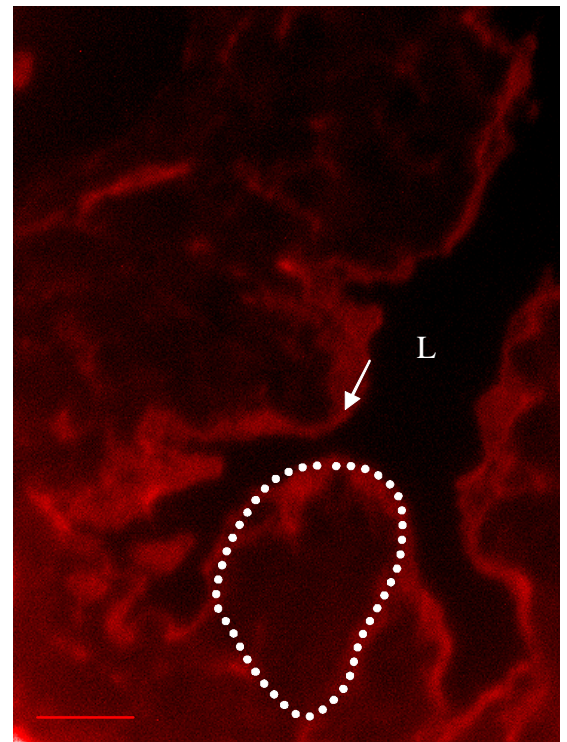
### **5.2.1 Immunofluoreszenz**

Durch Inkubation von Semidünnschnitten mit Antiseren gegen SNAP 23, Synaptobrevin und Syntaxin konnte das Vorkommen und die Lokalisation dieser SNARE-Proteine im Urothel der Ratte gezeigt werden (Abb. 7a–c). Die enddifferenzierten Deckzellen wiesen in der Immunofluoreszenz ein ähnliches Signalmuster auf, wie es durch die Inkubationen mit den Uroplakinantikörpern gezeigt werden konnte. Im apikalen Kompartiment der Deckzelle zeigte sich auch hier ein starkes Fluoreszenzsignal. Die untersuchten SNARE-Proteine kommen nach diesen immunologischen Untersuchungen ausschließlich in den enddifferenzierten Deckzellen des Urothels vor und sind hier im Bereich des apikalen Membrankompartiments stark angereichert. Im Zytoplasma fallen freie, nicht markierte Bereiche auf.

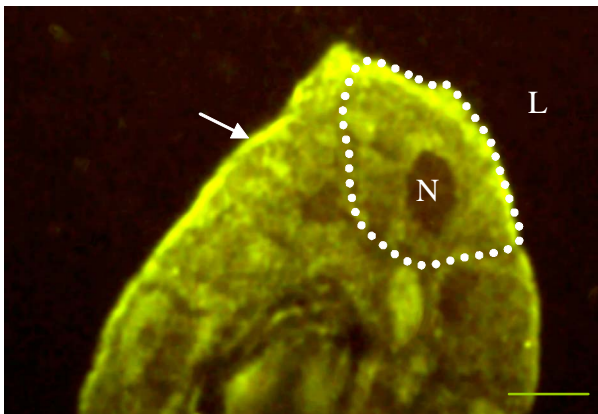
Da eine Inkubation dieser Schnitte mit Antiserum gegen SNAP 25 zu keinem spezifischem Signal führte, kann davon ausgegangen werden, dass SNAP 23, als Analogon von neuronalem SNAP 25, hier eine Rolle als Q-SNARE spielt. Das Verteilungsmuster von Synaptobrevin, SNAP 23 und Syntaxin in den Deckzellen gleicht dem von Uroplakin III (Abb. 3 und 4) und scheint auf den Bereich der diskoiden und fusiformen Vesikel im apikalen Membrankompartiment sowie der apikalen Plasmamembran beschränkt zu sein.



a



b



c

Abb. 7

Immunolokalisation von SNARE-Proteinen im Urothel der Rattenharnblase. Die drei untersuchten SNARE-Proteine Syntaxin (a), Synaptobrevin (b) und SNAP 23 (c) zeigen ein starkes Immunofluoreszenzsignal im apikalen Zellkompartiment. Im Bereich der luminalen Zellmembran (Pfeile) ist das Signal für alle drei untersuchten Proteine am stärksten ausgeprägt. Der teils wolkig-diffuse Hintergrund kann auf artifizielle Stauchung des Schnittes und damit die Umverteilung von tieferliegenden Zellstrukturen, wie Bereiche der Muscularis, zurückgeführt werden.

(L = Lumen, N = Zellkern; Markierter Bereich = Deckzelle Pfeile = apikale Plasmamembran Bar 10 µm)

Durch die Immunofluoreszenzuntersuchungen werden die Daten der Westernblot-Analyse unterstützt und es kann davon ausgegangen werden, dass SNAP 23 die relevante Komponente ist, die zusammen mit Synaptobrevin und Syntaxin den SNARE-Haftkomplex im Harnblasenepithel ausbildet. Eine parallel durchgeführte Inkubation mit Antiserum gegen SNAP 25 führte zu keinem spezifischen Signal. Die scheinbare Gleichverteilung aller drei SNARE-Proteine innerhalb der Zelle lässt eine zielgerichtete Fusion nach einem Mechanismus, wie er in Neuronen beschrieben wird, als eher unwahrscheinlich erscheinen. Auf Grund der Gleichverteilung (siehe auch 5.2.3) der SNARE-Proteine ist eine Unterteilung in die Ziel- oder die Vesikelmembran nicht möglich, vielmehr können die Vesikel untereinander aber auch mit der apikalen Plasmamembran fusionieren. Die immunohistologischen Daten deuten somit auf einen homotypischen Fusionsmechanismus hin, wie er für die Fusion der Hefevakuolen bekannt ist (Ungerman et al., 1998b).

### **5.2.2 Westernblotanalyse**

Zur Kontrolle der Reinheit der hier verwendeten Epithelpräparation wurde eine separate Präparation der Muskelschicht der Harnblase durchgeführt. Durch Inkubation der gelelektrophoretisch aufgetrennten und elektroeluierten Membransuspensionen mit urothel- beziehungsweise muskelspezifischen Antikörpern gegen Uroplakin III und  $\alpha$ -Aktin konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine Kontamination von SNARE-Proteinen aus der motorischen Endplatte durch die hier gewählte Präparationsmethode ausgeschlossen werden konnte (Abb. 10). Der Nachweis von Uroplakin III in der Epithelpräparation wurde als Positivkontrolle für das Epithel verwendet. Aktin konnte nur in der Präparation der Tunica muscularis nachgewiesen werden, während Uroplakin III nur in der Urothel- und nicht in der Muskelpräparation vorhanden war.

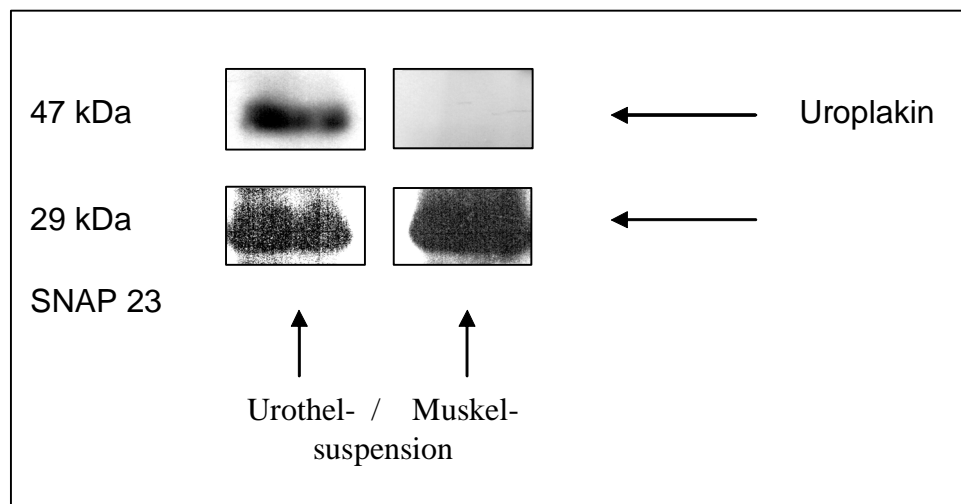
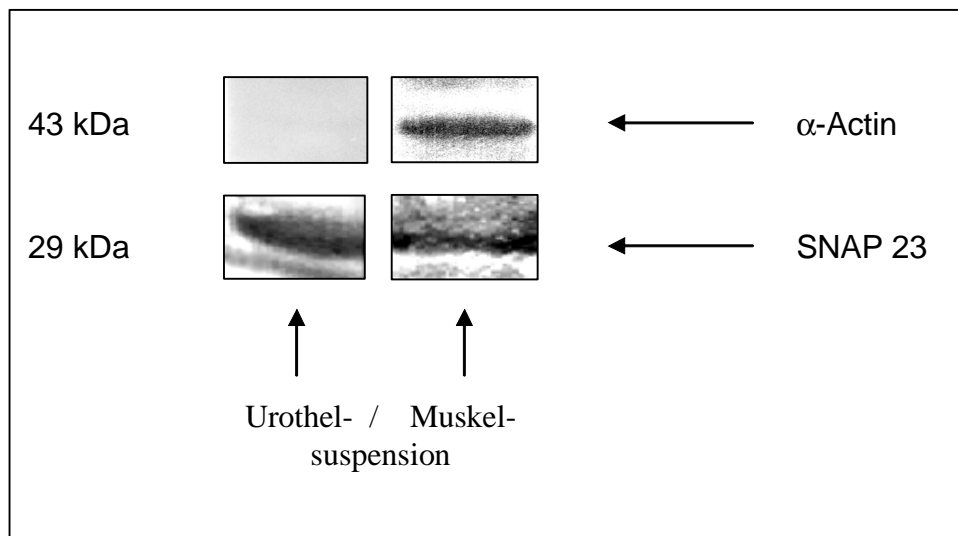


Abb. 10 Immunoblot einer Membranpräparation von Urothel und Tunica muscularis einer Rattenharnblase. SDS-PAGE 12%. SNAP 23 ist in beiden Präparationen detektiert, da in der motorischen Endplatte neuronale Strukturen vorhanden sind. Als Positivkontrolle für die Urothelpräparation wurde der monoklonale Antikörper gegen Uroplakin III eingesetzt (unten). Der monoklonale Antikörper gegen glattmuskuläres alpha-Aktin wurde als Negativkontrolle eingesetzt (oben). Nähere Erläuterungen dazu im Text.

Im Immunoblot der Membransuspension des Rattenurothels konnte die Detektion von Syntaxin, Synaptobrevin und SNAP 23 gezeigt werden (Abb. 11). Diesen Untersuchungen zu folge ist SNAP 25 offenbar nicht im Harnblasenepithel vorhanden. Wie auch für andere Epithelien gezeigt wurde, scheint auch in diesem Epithel SNAP 25 durch SNAP 23 ersetzt zu werden.

In einer vergleichenden Westernblotanalyse zwischen einer Präparation des Plexus choroideus und des Harnblasenepithels konnte dieser Befund bestätigt werden (Abb.12). Im Plexus choroideus ist sowohl SNAP 23 wie auch SNAP 25 vorhanden, im Harnblasenepithel nur die nicht neuronale SNAP 23 Isoform. SNAP 23 weist ein apparentes Molekulargewicht von 29 kDa auf, was eine Bestätigung verschiedener anderer Untersuchungen im Epithel des Pankreas oder der Mastzellen darstellt (Zhenheng et al., 1998). In anderen Epithelien ist SNAP 23 ebenfalls mit dem Molekulargewicht von 29 kDa vorhanden (Ravichandran et al., 1996).

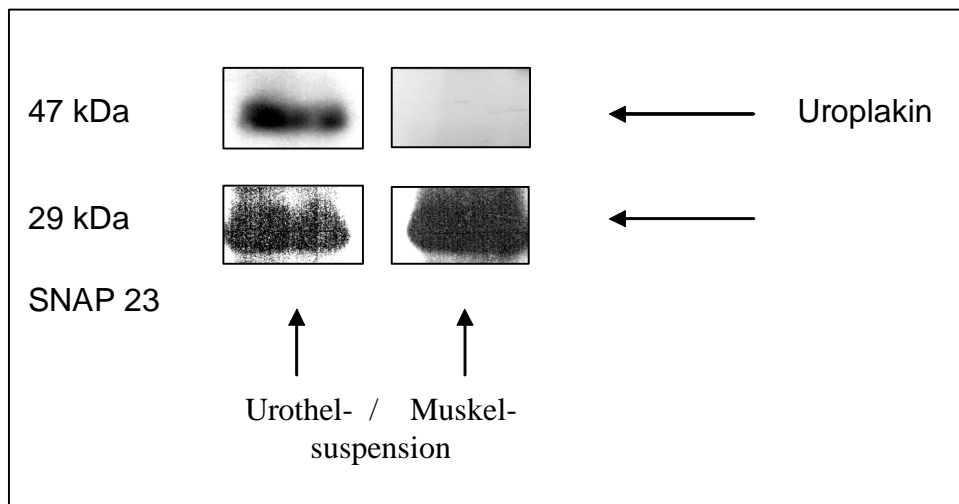


Abb. 10 Immunoblot einer Membranpräparation von Urothel und Tunica muscularis einer Rattenharnblase. SDS-PAGE 12%.

SNAP 23 ist in beiden Präparationen detektiert, da in der motorischen Endplatte neuronale Strukturen vorhanden sind.

Als Positivkontrolle für die Urothelpräparation wurde der monoklonale Antikörper gegen Uroplakin III eingesetzt (unten). Der monoklonale Antikörper gegen glattmuskuläres alpha-Aktin wurde als Negativkontrolle eingesetzt (oben).

Nähere Erläuterungen dazu im Text.

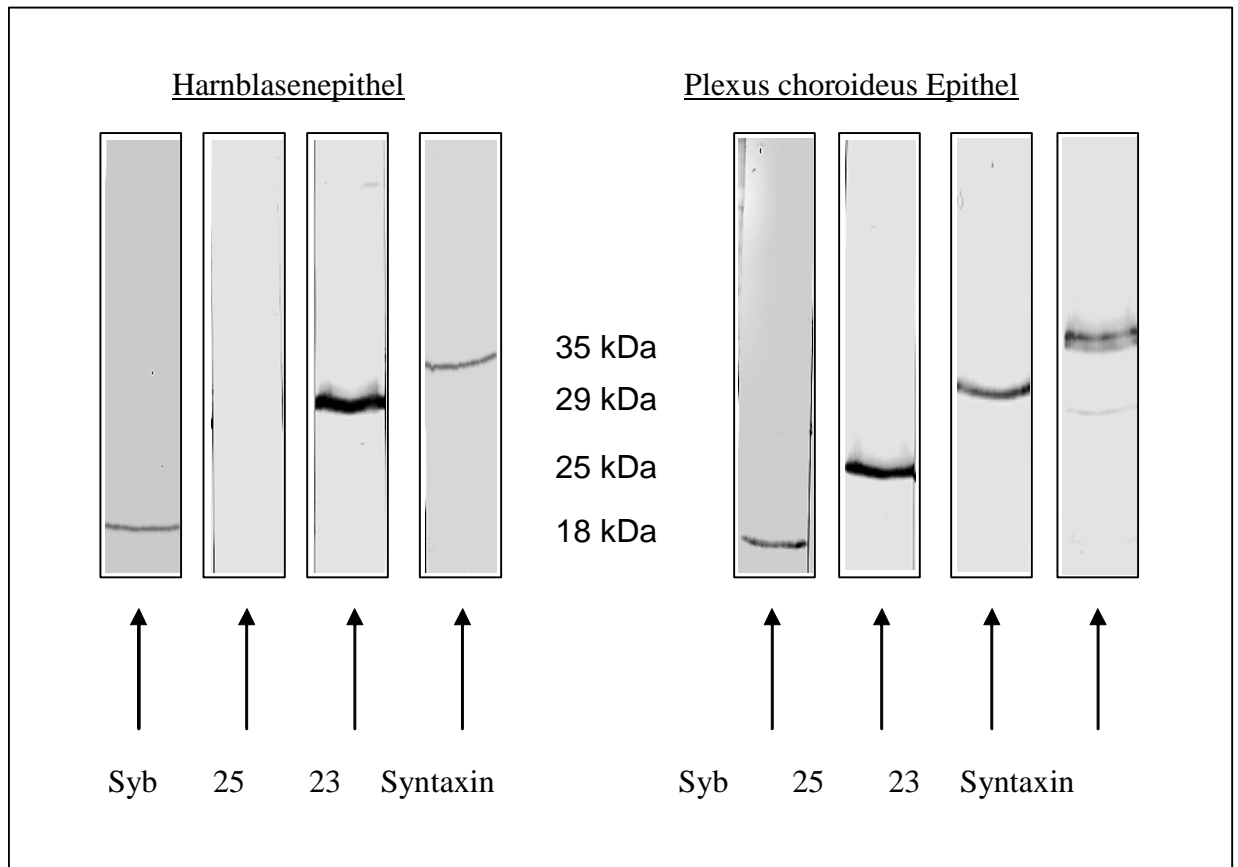
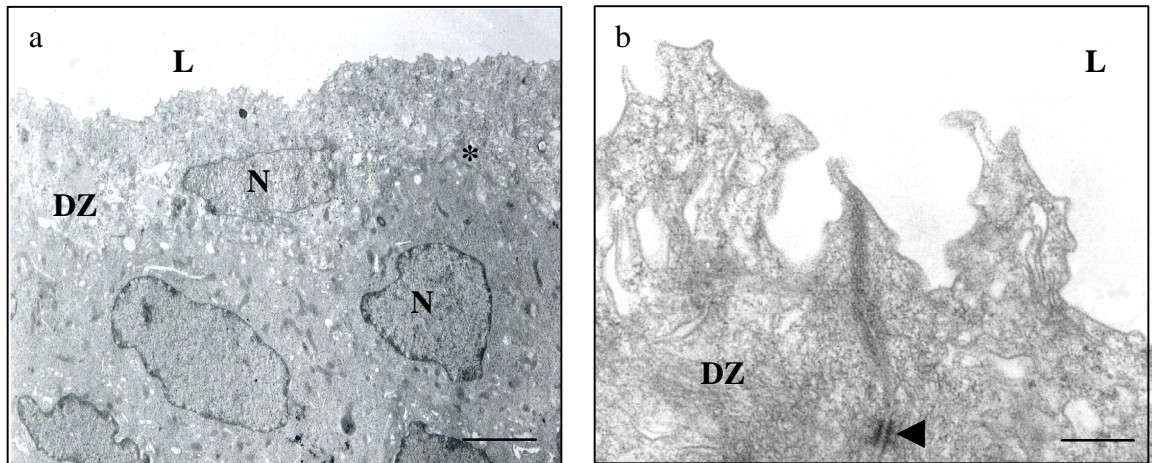


Abb. 12 Detektion von SNARE-Proteinen im Harnblasenepithel zum Vergleich mit dem Epithel im Plexus choroideus in der Ratte. SNAP 25 (25) kann nur im Epithel des Plexus choroideus gezeigt werden. Die SNARE-Proteine Synaptobrevin (Syb), SNAP 23 (23) und Syntaxin werden in beiden Epithelien exprimiert. Detektion mit monoklonalen Antikörpern [außer für SNAP 23]. SDS-PAGE 12%. Visuelle Entwicklung mit Chloronaphtol.

### 5.2.3 Ultrastrukturelle Lokalisation

Durch das Einbettungsverfahren nach Meyer et al. (1991) wurde eine sehr gute Gewebeerhaltung erreicht. Diese erlaubte es, anhand morphologischer Charakteristika wie der typischen vesikulären Strukturen im apikalen Kompartiment der Zellen, die Deckzellen des Urothels eindeutig zu bestimmen und von den tiefer liegenden Intermediärzellen zu unterscheiden (Abb. 13).



DZ    Deckzelle  
 N    Nucleus  
 L    Lumen

Bar 2,5  $\mu\text{m}$  (a); 0,4  $\mu\text{m}$  (b)

Abb. 13    Ultradünnschnitt (60 nm) des Harnblasenepithels der Ratte. Überblick einer Deckzelle. Zellmembran (\*) als Grenzstruktur zu den Intermediärzellen. Deckzellen weisen als Permeabilitätsbarriere gegen den aggressiven Urin starke Zonulae occludentes (Pfeil) zwischen den Zellen auf. Ein parazellulärer Durchtritt von Flüssigkeit wird so verhindert.

Die facettierte Gestalt der apikalen Plasmamembran und die direkt darunter liegenden vesikulären Strukturen geben ein sehr deutliches Bild der hier permanent ablaufenden Fusionsereignisse. An verschiedenen Abschnitten der apikalen Plasmamembran sind schlauch- oder beutelartige Membransysteme zu erkennen, die offensichtlich durch untereinander fusionierte diskoide Vesikel entstanden sind. Diese Membransysteme öffnen sich dann anscheinend durch ein weiteres Fusionsereignis mit der apikalen Membran zum Harnblasenlumen (Abb. 14).



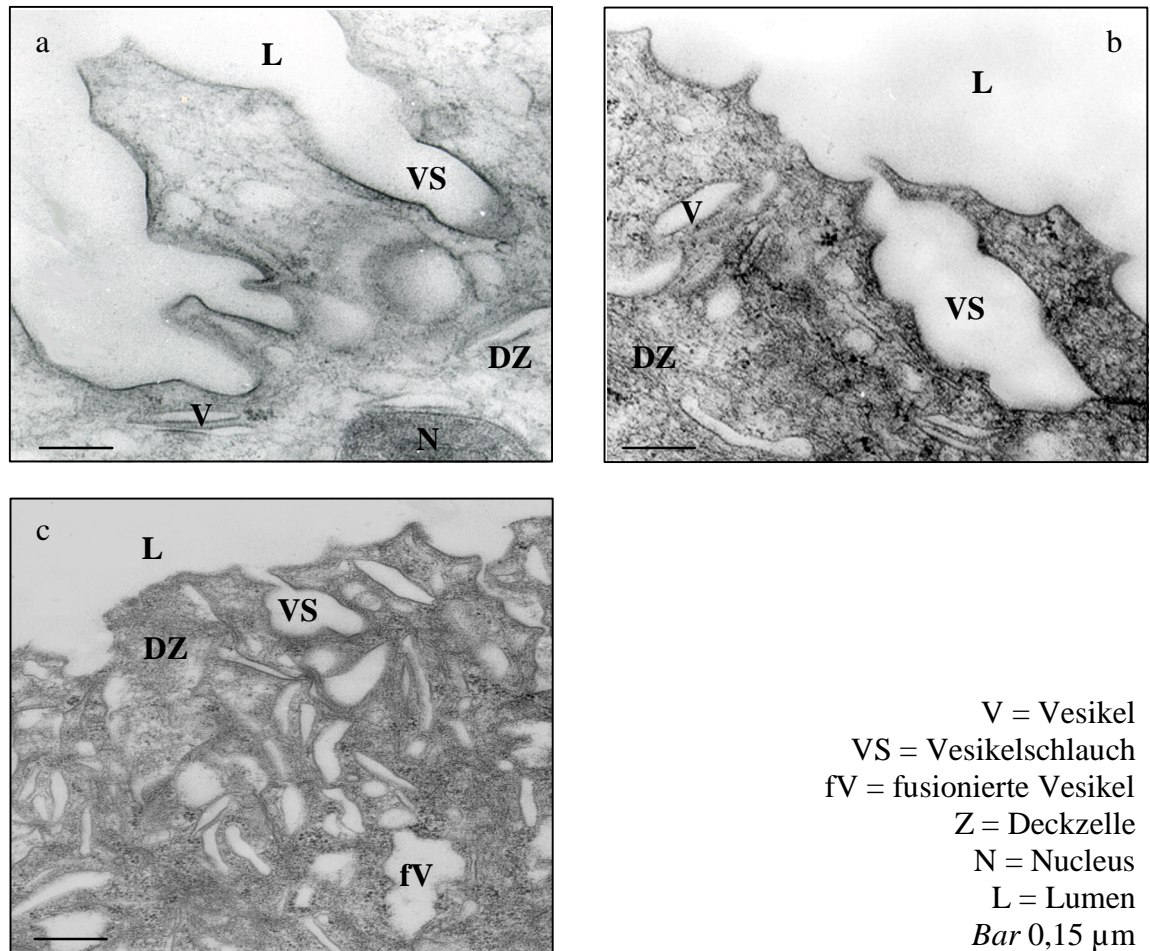
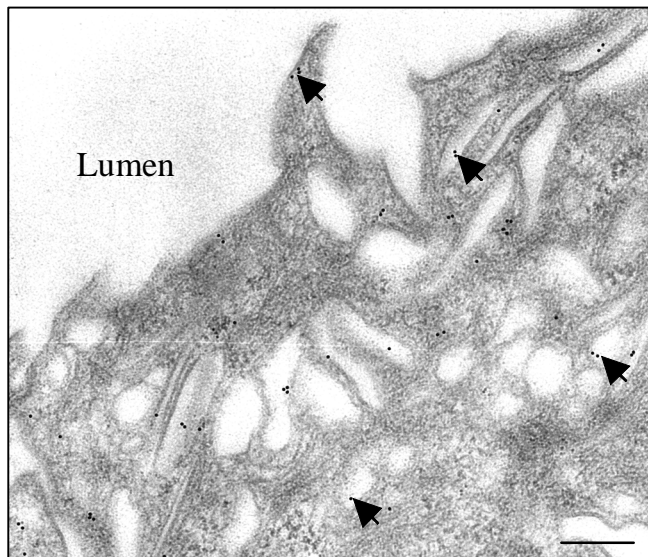


Abb. 14 Ultradünnschnitt (60 nm) des Harnblasenepithels der Ratte. Darstellung subzellulärer Strukturen. Die Deckzelle besitzt zum größten Teil apikal liegende fusiforme Vesikel, die mit ihren integralen Plaques die Zelle nach luminal abdichten. Dazu fusionieren die Vesikel mit der Plasmamembran (a) und die Innenseite wird nach luminal geklappt. Fusionieren die Vesikel untereinander, bilden sich Strukturen, die dann als Vesikelschlauch mit der Plasmamembran fusionieren (b). Auch ohne Kontakt zur apikalen Plasmamembran ist eine Fusion der Vesikel untereinander möglich (c).

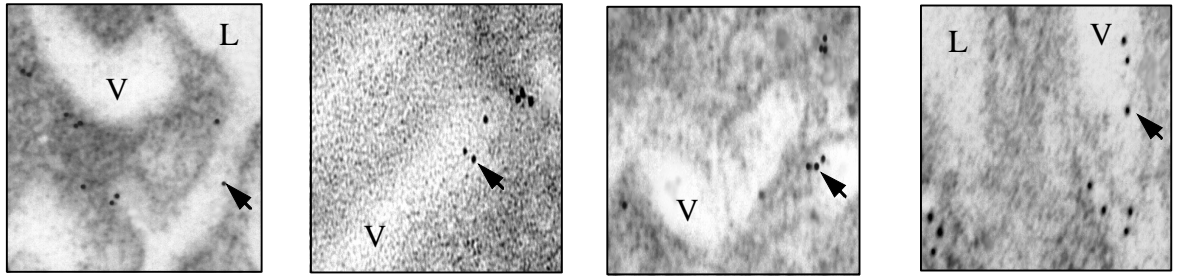
Inkubationen mit Antikörpern gegen die SNARE-Proteine Synaptobrevin, SNAP 23 und Syntaxin führten zu spezifischen Immunogoldmarkierungen im apikalen Membrankompartiment der Deckzellen. Sowohl die apikale Plasmamembran wie auch die vesikulären Strukturen im apikalen Kompartiment der Zellen wurden durch die Antikörper markiert. Es zeigte sich kein Unterschied im subzellulären Verteilungsmuster zwischen den untersuchten SNARE-Proteinen (Abb. 15 – 17). Die Immunlokalisation der Proteine entsprach in gleicher Weise, wie die lichtmikroskopische Immunofluoreszenz zeigt (siehe Abb. 4 und 5), der subzellulären Verteilung von Uroplakin III (Abb. 18).





*Bar 0,15 µm*

Abb. 15 Ultrastrukturelle Immunolokalisation von SNAP 23 im Harnblasenepithel der Ratte. Die Immunogoldmarkierung ist membranassoziiert. Sowohl die Membranen der diskoiden und fusiformen Vesikel, als auch die apikale Plasmamembran der Deckzellen sind immunopositiv (Pfeilspitzen).

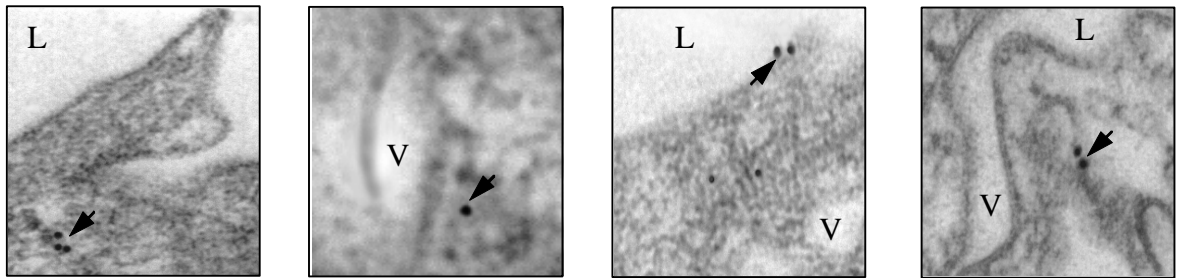


L = Lumen

V = Vesikel

Bar 0,1  $\mu$ m

Abb. 16 Immunogoldmarkierung von Syntaxin im Urothel der Ratte. Zur Detektion wurde ein monoklonaler Antikörper eingesetzt. Die Membranen der Vesikel als auch die luminale Plasmamembran sind immunopositiv für Syntaxin (Pfeilspitzen).

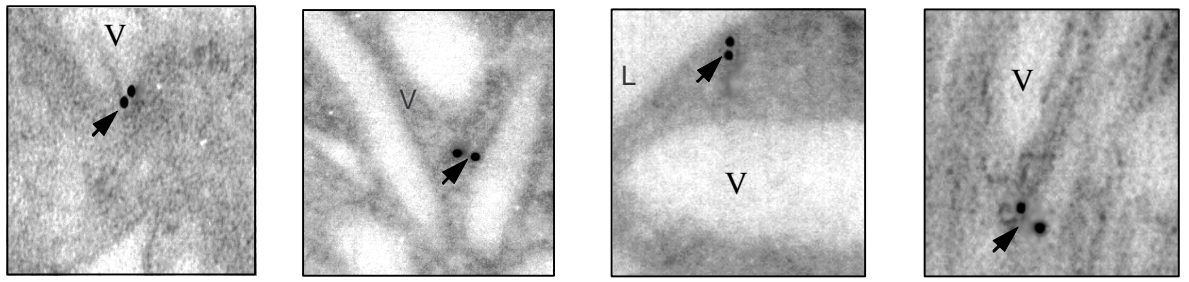


L = Lumen

V = Vesikel

Bar 0,1  $\mu$ m

Abb. 17 Immunogoldmarkierung im Ultradünnschnitt (60 nm) des Harnblasenepithels der Ratte. Lokalisation von Synaptobrevin (Pfeilspitzen) durch Detektion mit monoklonalem Antikörper. Markierung im apikalen Kompartiment der Deckzelle sowie auf der Vesikelmembran.



L = Lumen

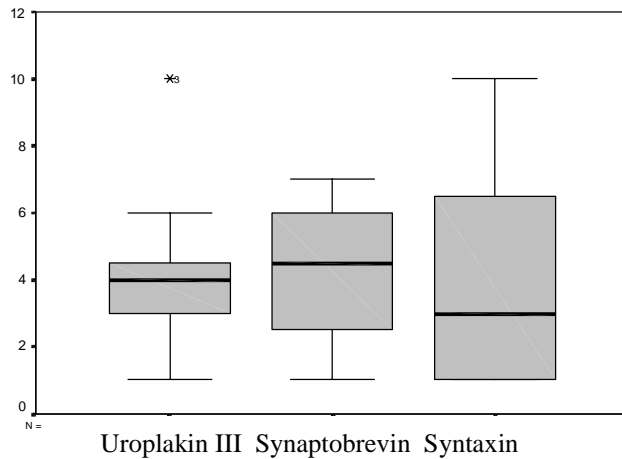
V = Vesikel

Bar 0,1  $\mu$ m

Abb. 18 Ultrastrukturelle Immunolokalisation von Uroplakin III im Harnblasenepithel der Ratte. Lokalisation im luminalen Kompartiment der Deckzelle. Detektion mit monoklonalem Antikörper und 5 nm Goldkolloiden.

Der explorativen Datenanalyse wurde eine Normalverteilung zu Grunde gelegt und die mittleren 50 % der Datensätze sind zum Vergleich herangezogen worden. Die Immunogoldmarkierungen der untersuchten Proteine wurden ausgezählt und jeweils für monoklonale Antikörper und polyklonale Seren im Box-Plot (Auftragung der Interquartilsabstände zu den absolut ausgezählten Goldmarkierungen für die jeweiligen Inkubationen) gegenübergestellt.

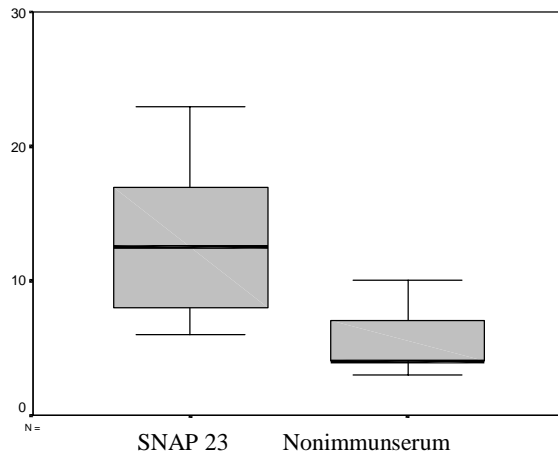
Die Mediane (markierte Linie in den Boxen) der Inkubationen mit den monoklonalen Antikörpern befinden sich jeweils in den Interquartilsbereichen der verglichenen Inkubationen (die Boxen bezeichnen die 25 % der kleinsten Werte – unteres Quartil und 25 % der größten Werte – oberes Quartil). Die Frage nach der gleichen Verteilung der SNARE-Proteine Synaptobrevin und Syntaxin im Vergleich zu Uroplakin U III kann daher beantwortet werden. Durch den Einsatz monoklonaler Antikörper gegen Synaptobrevin, Syntaxin und Uroplakin konnte anhand der statistischen Betrachtung eine Gleichverteilung im luminalen Kompartiment angenommen werden.



**Box – Plot I:** Darstellung der ausgezählten Goldkolloide von Inkubationen mit monoklonalen Antikörpern gegen Uroplakin III, Synaptobrevin und Syntaxin. Bei allen jeweils gültigen 20 Fällen (ausgezählte Gesamtschnittfläche ca. 400  $\mu\text{m}^2$ ) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ). Markierter Ausreißer von 10 gezählten Markierungen bei einer Inkubation gegen Uroplakin III. Nähere Erläuterung im Text.

Ana

log zur Auswertung der Inkubationen mit den monoklonalen Antikörpern wurde die Datenanalyse für das polyklonale Serum gegen SNAP 23 durchgeführt. Als Referenz erfolgte die parallele Inkubation mit einem Nonimmunserum. Wie im Box–Plot II dargestellt, zeigt die Markierung von SNAP 23 ein eindeutiges Signal. Der Median der Inkubation mit Nonimmunserum liegt deutlich außerhalb der mittleren 50% der Markierungen von Inkubationen gegen SNAP 23. Der Einsatz von polyklonalem Antiserum zum Nachweis von SNAP 23 im luminalen Kompartiment der Deckzelle ist daher geeignet. Die höhere Anzahl und größere Streuung der ausgezählten Goldkolloide bei dieser Inkubation lässt sich auf unspezifische Bindungen polyklonaler Antiseren zurückführen.



**Box – Plot II:** Darstellung der ausgezählten Inkubationen mit polyklonalem Antiserum gegen SNAP 23 im Vergleich zu Inkubationen mit Nonimmunserum. Von den jeweils gültigen 20 Fällen (ausgezählte Gesamtschnittfläche ca. 400  $\mu\text{m}^2$ ) zeigt sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ). Nähere Erläuterung im Text.

Die statistische Auswertung der Antikörpermarkierungen zeigte eine gleiche Verteilung der drei untersuchten SNARE–Proteine entlang der apikalen Plasmamembran der Deckzellen und der Membran der diskoiden und fusiformen Vesikel. Eine Unterteilung in Vesikel- oder Zielmembran–SNARE–Proteine war somit nicht möglich.

### 5.3 Ausbildung des SNARE–Haftkomplexes im Urothel der Ratte

Für die Fusion von Membranen oder Membranbestandteilen ist ein SNARE–Haftkomplex erforderlich, der die fusionierenden Membranen ausrichtet und die konformationellen Zwänge der Lipidmembranen überwindet, damit der Fusionsprozess realisiert werden kann. Diese Konformationsänderungen führen letztlich zur ausreichenden Annäherung der Lipidmembranen.

In einer Immunopräzipitation mit einem gegen SNAP 23 gerichteten Antiserum konnte die Ausbildung eines SNARE–Komplexes im Urothel der Rattenharnblase gezeigt werden (Abb. 19). Die Immunopräzipitation führte zur Kopräzipitation von Syntaxin und Synaptobrevin.

Eine parallel durchgeführte Präzipitation mit SNAP 25 (der neuronalen Isoform von

SNAP 23) führte nicht zur Präzipitation der genannten SNARE-Proteine. Im Gegensatz zu der Ausbildung des Haftkomplexes in Neuronen scheint SNAP 23 die Rolle von SNAP 25 im Urothel zu übernehmen.

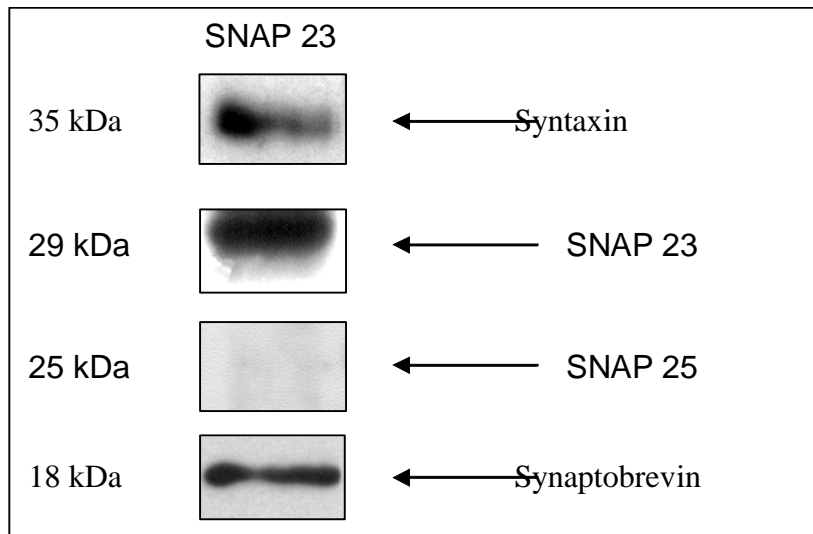


Abb. 19 Immunopräzipitation von Syntaxin und Synaptobrevin mit Antiserum gegen SNAP 23. Membranpräparation des Urothels der Ratte. Das SNAP 23-Antiserum präzipitiert einen Proteinkomplex, der Syntaxin, Synaptobrevin und SNAP 23 enthält. SDS-PAGE 12%. Es wurden monoklonale Antikörper eingesetzt [außer für SNAP 23].

Als Regulatorproteine von Fusionsproteinen konnten NSF und  $\alpha$ -SNAP nachgewiesen werden. Eine Protein-Bande bei 70 kDa wurde in der Westernblotanalyse gezeigt (Abb. 20). Als Kontrolle diente eine Membranpräparation aus dem Hirnhomogenat einer adulten Ratte. Für eine Bindung von NSF an diesen Haftkomplex ist eine vorausgegangene Bindung von Adaptorproteinen erforderlich. Wie für die Parietalzellen des Magens gezeigt wurde, spielen diese Regulatorproteine für den homotypischen Fusionsprozess der tubulären Vesikel untereinander und der canaliculären Membran in diesen Zellen eine Rolle (Lehnardt et al., 2000). Das Vorhandensein von NSF und  $\alpha$ -SNAP spricht für einen ähnlichen Fusionsprozess.

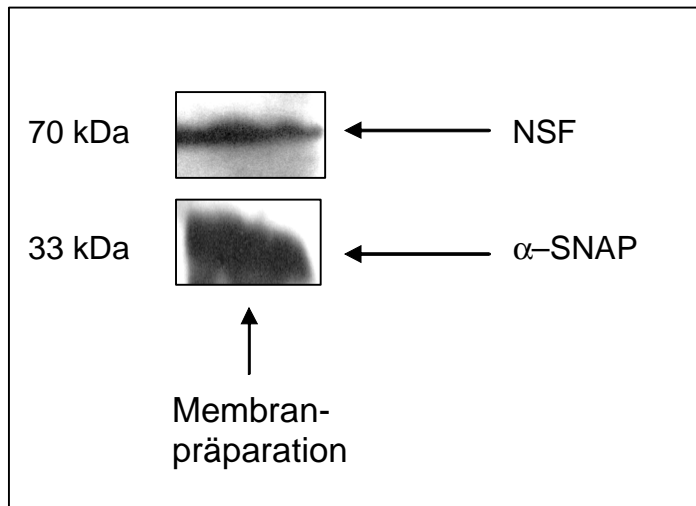


Abb. 20 Immunoblot von NSF und  $\alpha$ -SNAP. SDS-PAGE 12%. Membranpräparation des Urothels der Ratte. Zur Kontrolle wurde Hirnhomogenat der Ratte inkubiert (nicht gezeigt). In beiden Präparationen wird NSF (70 kDa) durch das polyklonale Antiserum detektiert. Der monoklonale Antikörper detektiert  $\alpha$ -SNAP in der Membranpräparationen.

## **5.4 Detektion von Uroplakin als Deckzellprotein im Urin**

### **5.4.1 Westernblotanalyse**

Um zu untersuchen, ob unter physiologischen Bedingungen apikale Teile der Plasmamembran von Deckzellen abgegeben und mit dem Urin ausgespült werden, sollte Uroplakin III im Urin von gesunden Probanden beider Geschlechter detektiert werden.

Nach Ausfällung des Gesamteiweißes aus menschlichem Urin konnte Uroplakin im Immunoblot nachgewiesen werden. Des Weiteren war der Nachweis von Zytokeratin 20, einem Bestandteil des luminalen Kompartiments des Zytoskeletts der Deckzellen (Moll et al., 1990) möglich (Abb. 21).

Selbst im nicht angereicherten physiologischen Urin konnte Uroplakin nachgewiesen werden. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung von 20 µl Urin, was einer Gesamtproteinmenge von 1 – 3 µg entspricht, konnte Uroplakin III nach Antikörperinkubation als typische Doppelbande identifiziert werden (Abb. 22a). Das Erscheinen einer Doppelbande im Immunoblot ist auf die hier durchgeführte Behandlung mit beta-Mercaptoethanol zurückzuführen (Wu, X. R. und T. T. Sun, 1993).

Eine parallel durchgeführte Westernblotanalyse von Urin aus der Rattenharnblase war ebenfalls für Uroplakin III positiv. Es stellte sich die Frage, ob es sich bei den vorliegenden Befunden um den Abgang ganzer Zellen, größerer Zellbruchstücke oder kleiner Membranbestandteile handelt. Zur Klärung dieser Frage wurden mit Hilfe eines graduierten Zentrifugationsexperiments die Urinsedimente von 3'000 g, 5'000 g, 10'000 g, 200'000 g und 540'000 g im Immunoblot analysiert. Es konnte so gezeigt werden, dass im ausgeschiedenen Urin sowohl Zelltrümmer, Membranbestandteile und auch vesikuläre Strukturen sehr unterschiedlicher Größe bzw. Dichte vorhanden sind. Sowohl in Sedimenten von Zentrifugationen mittlerer g-Zahl, als auch in der Ultrazentrifugation konnte Uroplakin III nachgewiesen werden (Abb. 22b). Nach niedertourigen Zentrifugationen bei 800 g wurde kein Immunsignal für Uroplakin erhalten, was vermuten lässt, dass physiologisch keine ganzen Zellen des Urothels abschilfern und mit dem Urin abgegeben werden.



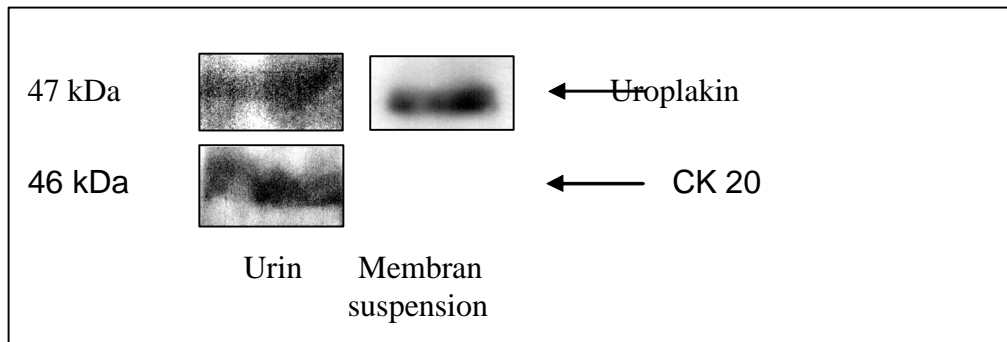


Abb. 21 Immunoblot von Uroplakin im Urin nach Proteinfällung. SDS-PAGE 12%. Detektion von Uroplakin III bei 47 kDa. Als Positivkontrolle ist der Immunoblot der Membranpräparation des Urothels der Ratte gezeigt. Zytokeratin (CK 20) ist bei 46 kDa detektiert. Es wurden monoklonale Antikörper eingesetzt.

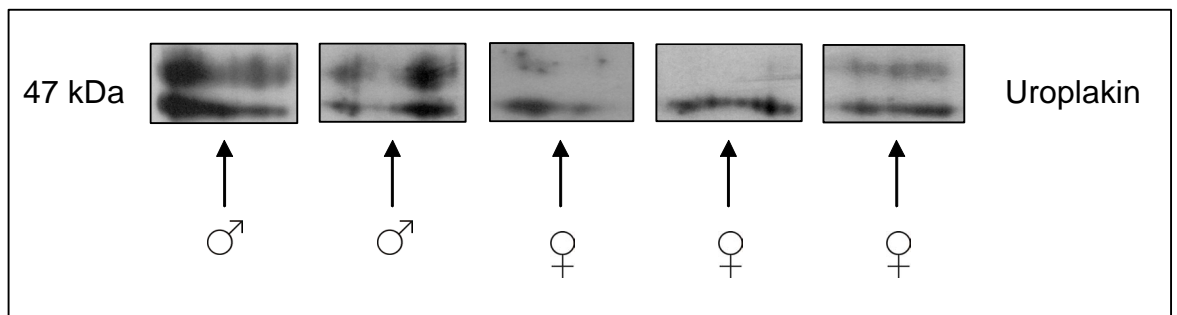


Abb. 22a Immunoblot von Uroplakin von zentrifugiertem Urin. SDS-PAGE 12%. Es wurde der Urin von weiblichen und männlichen gesunden Personen untersucht. Nähere Erläuterungen im Text.

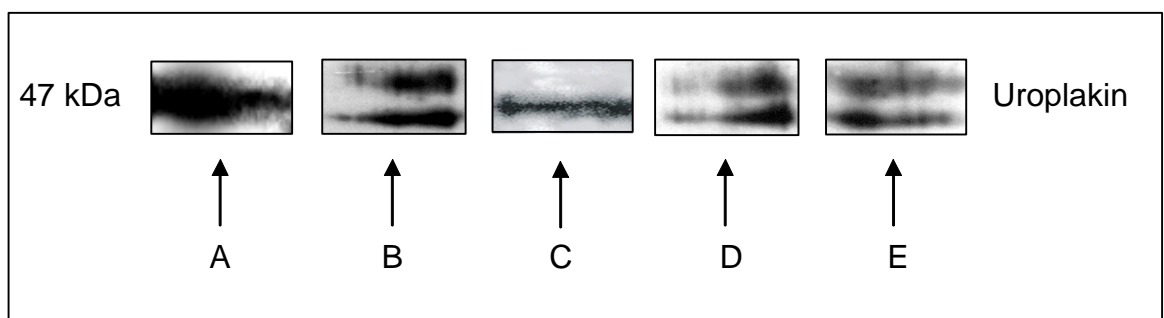


Abb. 22b Immunoblot von Uroplakin nach gradueller Zentrifugation von Urin. SDS-PAGE 12%. Spezifische Bande für Uroplakin III bei 47 kDa in allen Zentrifugationsfraktionen. Nähere Erläuterungen im Text.

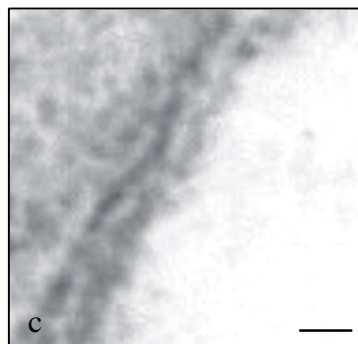
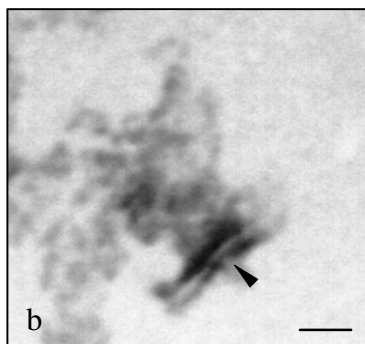
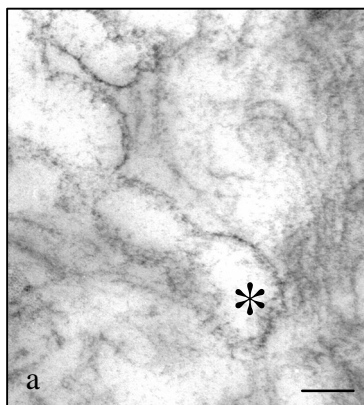
A	3'000x g	D	200'000x g
B	5'000x g	E	540'000x g
C	10'000x g		

### 5.4.2 Ultrastruktur des Urinsediments

Dem Nachweis von Uroplakin in der Westernblotanalyse folgte die elektronenmikroskopische Untersuchung des Urinsediments nach einer Zentrifugation von 3'000 g. Es sollte untersucht werden, welche Uroplakin assoziierten Strukturen im Urinsediment vorkommen. Lassen sich Membranabschnitte oder vesikuläre Strukturen im Urinsediment darstellen?

Der Nachweis von Membranbruchstücken und vesikulären Strukturen subzellulären Ursprungs kann nicht optimal bewertet werden, weil eine optimale Gewebeerhaltung nach der Urinzentrifugation nicht zu erwarten ist.

Die eingangs gestellte Frage konnte somit nicht eindeutig beantwortet werden, da es sich bei den vorliegenden Ultradünnschnitten (60 nm) auch um Artefakte handeln könnte, die auf angewandte Untersuchungsmethoden zurückzuführen sind.



Bar 0,15  $\mu\text{m}$  (a);  
0,04  $\mu\text{m}$  (b,c)

Abb. 23 Ultrastruktur von Urinsediment. Zentrifugation von physiologischem, unbehandeltem Urin bei 3'000x g. In Abb. a vesikelähnliche Strukturen (\*), die keine definierten Membranen aufweisen. Es fanden sich Fragmente (Pfeilspitze in b), die eine membranähnliche Struktur aufwiesen. Zum Vergleich Plasmamembran einer Deckzelle (c). Nähere Erläuterungen im Text.

## **6 Diskussion**

### **6.1 Terminologie**

Nahezu die gesamte luminale Oberfläche der harnableitenden Organe ist mit einem hochspezialisierten Epithel, dem Urothel, ausgekleidet. Diese Epithel-  
auskleidung ist so beschaffen, dass sie dem Urin dauerhaft widerstehen kann und  
auf diese Weise ein unkontrolliertes Eindringen von Urin mit einem teilweise  
aggressiven Milieu in die angrenzenden Gewebereiche verhindert. Für diese  
Schutzfunktion sind weitestgehend die enddifferenzierten Deckzellen  
verantwortlich, denn nur die Deckzellen stehen in direktem Kontakt mit dem Urin  
und sind untereinander durch sehr gut ausgebildete Zonulae occludentes  
verbunden. Eine parazelluläre Diffusion von Urinbestandteilen ist somit nicht  
möglich. Die Deckzellen weisen eine ungewöhnliche Morphologie auf und stehen  
möglicher Weise über lange zytoplasmatische Ausziehungen mit der  
Basalmembran im Kontakt. Sie können im Verbund mit den Intermediär- und den  
Basalzellen des Urothels die Volumenschwankungen, wie sie insbesondere in der  
Harnblase vorkommen, durch ein beträchtliches Dehnungsvermögen ausgleichen.  
In dieser Untersuchung war kein Hinweis auf einen direkten Kontakt von  
Deckzellen mit der Basalmembran zu beobachten, was möglicherweise aber auf  
die sehr dünnen Schnitte, die in dieser Studie verwendet wurden, zurückzuführen  
ist. Schlanke Zellausläufer konnten so eventuell nicht mit der verwendeten  
Schnittebene erfasst werden.

### **6.2 SNARE-Proteine im Urothel der Ratte**

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Untersuchung des apikalen  
Membrankompartiments der Deckzellen. Dieses lässt sich in die luminale  
Plasmamembran der Zelle und den apikalen vesikulären Strukturen unterteilen.  
Die Plasmamembran erhält durch Einlagerung von zahlreichen Urothelplaques ein  
facettenartiges Aussehen, was auch zu der Bezeichnung „facet cells“ geführt hat.

Außerdem kommen innerhalb der Zellen diskoide und fusiforme Vesikel vor, die hauptsächlich im apikalen Zellpol angereichert sind und als apikale Reservemembranen angesehen werden können. Sowohl in der Membran der Vesikel wie auch in der Zellmembran ist Uroplakin III, als dominierendes Membranprotein vorhanden. Dieses bildet, wie in der Einleitung genauer beschrieben, hexagonale Strukturen aus, die der Membran ihre hohe Widerstandsfähigkeit gegen das aggressive Milieu des Urins vermitteln. Die Vesikel finden Kontakt zur apikalen Plasmamembran und scheinen in einem kontinuierlichen Prozess mit dieser zu verschmelzen. Der Mechanismus, der dieser Verschmelzung zu Grunde liegt, war bisher nicht bekannt. Von verschiedenen anderen Epithelzellen wie z. B. aus den Sammelrohrzellen in den Nieren (Jo et al., 1995) oder den Parietalzellen des Magens (Jöns et al., 1999) war bekannt, dass auch in diesen Zellen vesikuläre Membranen mit der apikalen Plasmamembran der Zellen fusionieren und so die Membranoberfläche vergrößern. Die integralen Membranproteine der Vesikelmembran können so in die Zellmembran integriert werden, was zum Beispiel in den Parietalzellen des Magens zu einer Steigerung der HCl-Sekretion führt (Jöns et al., 1999). Für diese Fusionsvorgänge werden Mechanismen diskutiert, die Ähnlichkeiten mit der Fusion von synaptischen Vesikeln an der präsynaptischen Membran aufweisen. Für den Vorgang der neuronalen Fusion wurde die SNARE-Hypothese aufgestellt (Jahn und Südhof, 1994). Diese Hypothese postuliert als einen initialen ersten Schritt, vor der eigentlichen Fusion, die Ausbildung eines Haftkomplexes zwischen den SNARE-Proteinen Synaptobrevin, Syntaxin und SNAP 25. Diese SNARE-Proteine wurden mittlerweile auch in verschiedenen Epithelzellen, wie in den oben aufgeführten gefunden und spielen hier wahrscheinlich auch eine wichtige Rolle bei Membranfusionen in diesen Zellen.

Wir konnten in Westernblot-Analysen zeigen, dass auch im Epithel der Harnblase der Ratte SNARE-Proteine vorkommen. Neben Synaptobrevin und Syntaxin konnte SNAP 23, eine epitheliale Isoform von neuronalem SNAP 25 (Ravichandran et al., 1996), nachgewiesen werden. Immunopräzipitationen mit SNAP 23 Antikörpern zeigten, dass auch im Urothel ein Komplex zwischen den identifizierten Proteinen ausgebildet wird. Die SNAP 23 Antikörper kopräzipitierten sowohl Synaptobrevin als auch Syntaxin. Obwohl durch Kontrollinkubationen mit

Antikörpern gegen Uroplakin und  $\alpha$ -Aktin die Spezifität der Harnblasen-epithelpräparation nachgewiesen werden konnte, war es anhand der Westernblot-Analysen nicht möglich, die identifizierten SNARE-Proteine nur den Deckzellen zuzuordnen. Zur Beurteilung der zellulären und subzellulären Lokalisation wurden deshalb Inkubationen von Semidünnschnitten des Harnblasenepithels der Harnblase angefertigt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Synaptobrevin, wie auch Syntaxin und SNAP 23 im Deckzellepithel vorhanden sind. Die Antikörpermarkierung befand sich überwiegend an der apikalen Plasmamembran und auch an den Membranen der intrazellulären Vesikel im apikalen Zellpol. Diese Antikörpermarkierung entsprach somit der von Uroplakin III, welches in Kontrollschnitten zur Anwendung kam. Für alle drei SNARE-Proteine konnte ebenfalls eine ultrastrukturelle Lokalisation gezeigt werden. Hier wurde bestätigt, dass die Antikörpermarkierung tatsächlich ausschließlich an der apikalen Zellmembranen sowie an der vesikulären Membran der Deckzellen vorhanden ist. Eine überraschende Beobachtung war, dass alle drei SNARE-Proteine in einem identischen subzellulären Verteilungsmuster gefunden wurden und es nicht, wie es für die heterotypische Fusion der synaptischen Vesikel an der Synapse beschrieben ist, zu einer unterschiedlichen Verteilung von Vesikel- und Ziel-SNARE-Proteinen kommt.

Wir fanden im Harnblasenepithel alle drei SNARE-Proteine auf der Membran der diskoiden Vesikel als auch auf der apikalen Zellmembran, so dass uns ein klassischer heterotypischer Fusionsmechanismus sehr unwahrscheinlich erscheint. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei den Membranfusionen des apikalen Membrankompartiments der Deckzellen um eine Kombination von homotypischen Fusionen und heterotypischen Fusionen handeln muß.

### **6.3 Modell der homotypischen Fusion in Deckzellen**

Homotypische Membranfusionen sind erstmals bei der Fusion von Vakuolen der Hefe beschrieben worden. Auf den Membranen dieser Vakuolen sind alle drei SNARE-Proteine vorhanden, so kann jede Vakuole sowohl als Ziel- und auch als Vesikelmembran dienen. Damit können so homotypische Verschmelzungen stattfinden (Wilson et al., 1989; Ungerman et al., 1998b).

Für die Fusionsvorgänge im apikalen Membrankompartiment der Deckzellen wurde folgende Modellvorstellung entwickelt (Abb. 24). Mehrere diskoidale oder fusiforme Vesikel verschmelzen miteinander und finden dann durch vereinzelte heterotypische Fusionen mit apikalen Plasmamembranabschnitten Zugang zum Lumen der Harnblase. Es entsteht ein Vesikelschlauch, der über die Länge der fusionierten Vesikel reicht. Nach den ultrastrukturellen Befunden finden zusätzlich auch normale heterotypische Fusionsvorgänge von einzelnen Vesikeln mit der apikalen Membran statt.

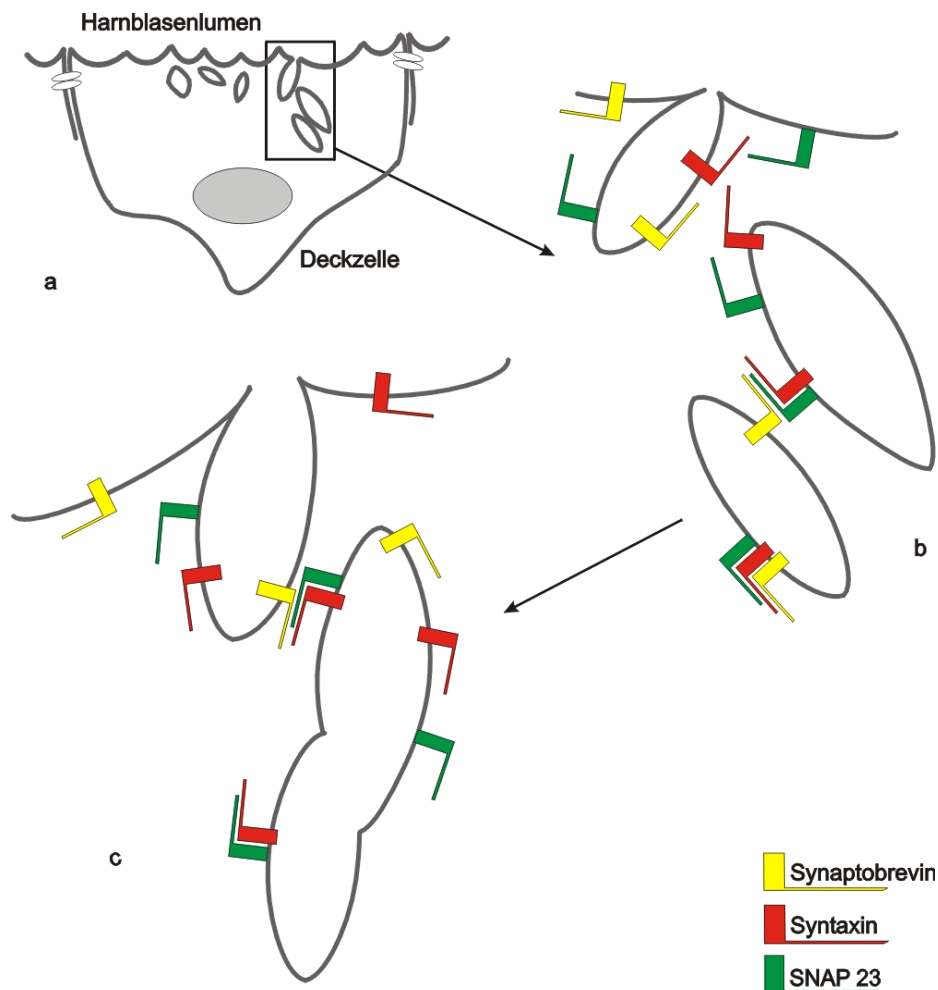


Abb. 24 a Deckzelle, schematisch dargestellt  
 b Fusion fusiformer Vesikel zu einem Vesikelschlauch  
 c homotypische Fusion der Vesikel mit der apikalen Plasmamembran

Ein Haftkomplex, bestehend aus Synaptobrevin, Syntaxin und SNAP 23, bildet sich an den Membranen von Vesikel und luminaler Deckzelle aus. Eine Fusion ist so zwischen den Vesikeln (b, c) möglich. Einzelne Vesikel können auch heterotypisch mit der Plasmamembran fusionieren (b, oben). Es kommt zur Ausbildung eines Vesikelschlauches, der dann zum Lumen hin aufklappt.

Außer den eigentlichen SNARE-Proteinen konnten wir mit alpha, beta-SNAP und NSF zwei weitere Proteine im Urothel nachweisen, die für die Membranfusion von entscheidender Bedeutung sind. Die Funktion, die diese Proteine in den Deckzellen haben könnten, ist bisher noch rein spekulativ. Es wäre aber denkbar, dass alpha, beta-SNAP und NSF für das Lösen der lateralen SNARE-Komplexe verantwortlich sind. Diese bilden sich spontan auf Membranen aus, die alle drei SNARE-Proteine enthalten. Vor der Ausbildung des eigentlichen Haftkomplexes zwischen den fusionierenden Membranen müssen diese gelöst werden. Eine derartige Funktion von alpha, beta-SNAP und NSF wird für die Fusion von

Vakuolen in der Hefe sowie für die Fusion der tubulären Vesikel in den Parietalzellen des Magens diskutiert (Lehnardt et al., 2000).

Ob es sich bei den beschriebenen Fusionsvorgängen um einen kontinuierlichen Prozess handelt oder ob es einen physiologischen Stimulus gibt, der die Fusionsvorgänge aktiviert oder beschleunigt, kann noch nicht beantwortet werden. Vorstellbar wäre, dass über einen Dehnungsreiz, wie er durch eine vermehrte Füllung der Harnblase ausgelöst wird, eine gesteigerte Fusionstätigkeit angeregt wird. Eine weitere Möglichkeit wäre auch, dass Mikrotraumen oder eine Alterung der apikalen Oberfläche registriert werden und es dann infolge der Fusion intrazellulärer Vesikel mit der apikalen Plasmamembran und einer synchronisierten Endozytose oder durch ein Abknospen des gealterten oder verletzten Membranabschnitts zu einem Membranaustausch kommt. Auf diese Weise könnte die Integrität der Membran erhalten bleiben. Die Notwendigkeit für eine wiederholte Erneuerung der apikalen Plasmamembran ergibt sich auch aus der ungewöhnlich langen Lebensspanne, die die enddifferenzierten Deckzellen aufweisen. Im Vergleich zu anderen Epithelzellen wie den Darmepithelzellen, die nach 1,5 bis 4,5 Tagen absterben und ins Darmlumen abgegeben werden, haben die Deckzellen des Urothels eine durchschnittliche Lebenserwartung von 200 Tagen. In unseren lichtmikroskopischen und ultrastrukturellen Untersuchungen konnten wir keinen Hinweis auf eine durch Endozytose bedingte Wiederaufnahme von Bereichen der apikalen Plasmamembran beobachten. Auch Inkubationen mit Antikörpern gegen Clathrin brachten keine Hinweise, die auf eine clathrinvermittelte Endozytose schließen ließen. Bei einer Endozytose käme es mit der Vesikulation von luminalen Membranabschnitten aus der Plasmamembran zu einer Aufnahme des Ausscheidungsprodukts Urin in die Zelle, welches sich für den Zellstoffwechsel mit Sicherheit als schädlich herausstellen würde. Hingegen konnten in den ultrastrukturellen Untersuchungen zahlreiche Membranabschnitte identifiziert werden, die das Bild von abknospenden Membranen zeigten.

## **6.4 Uroplakin**

Um die mit dem Urin ausgeschiedenen Membranen nachweisen zu können, wurde in einer Westernblotanalyse nach dem Hauptmembranprotein Uroplakin III



gesucht. Zu unserer Überraschung konnte Uroplakin III nicht nur im Präzipitat nach Fällung einer größeren Menge Urin nachgewiesen werden, sondern wurde auch nach Auftragung von nur 20 µl Normalurin, welches in etwa 1 – 3 µg Gesamtprotein entspricht, deutlich positiv markiert. Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob immer Membranvesikel einer definierten Größe von den Deckzellen abgegeben werden oder ob unterschiedliche Vesikelgrößen vorkommen oder evt. sogar ganze Zellen mit dem Urin abgegeben werden, haben wir eine Zentrifugationsanalyse durchgeführt und die so gewonnenen Sedimente wiederum im Westernblot getestet. Wir fanden keinen eindeutigen Hinweis auf ein Vorkommen von ganzen Zellen oder von größeren Zelltrümmern. Allerdings konnten wir kleinere Membranbestandteile sehr unterschiedlicher Größe und Dichte im Urin identifizieren. Einander nachfolgende Zentrifugationen mit 3'000 g bis 540'000 g erbrachten jeweils einen positiven Nachweis von Uroplakin III im Sediment. Dieses Ergebnis findet seine Bestätigung in den ultrastrukturellen Darstellungen, hier konnten ebenfalls sehr kleine abknospende Vesikel als auch größere zusammenhängende Membranabschnitte gezeigt werden. Der positive Befund der Westernblotanalyse mit Antikörpern gegen Zytokeratin 20 im ausgefällten Urinsediment konnte eine Abgabe von größeren Zellbestandteilen oder ganzen Zellen zeigen (Abb. 25).

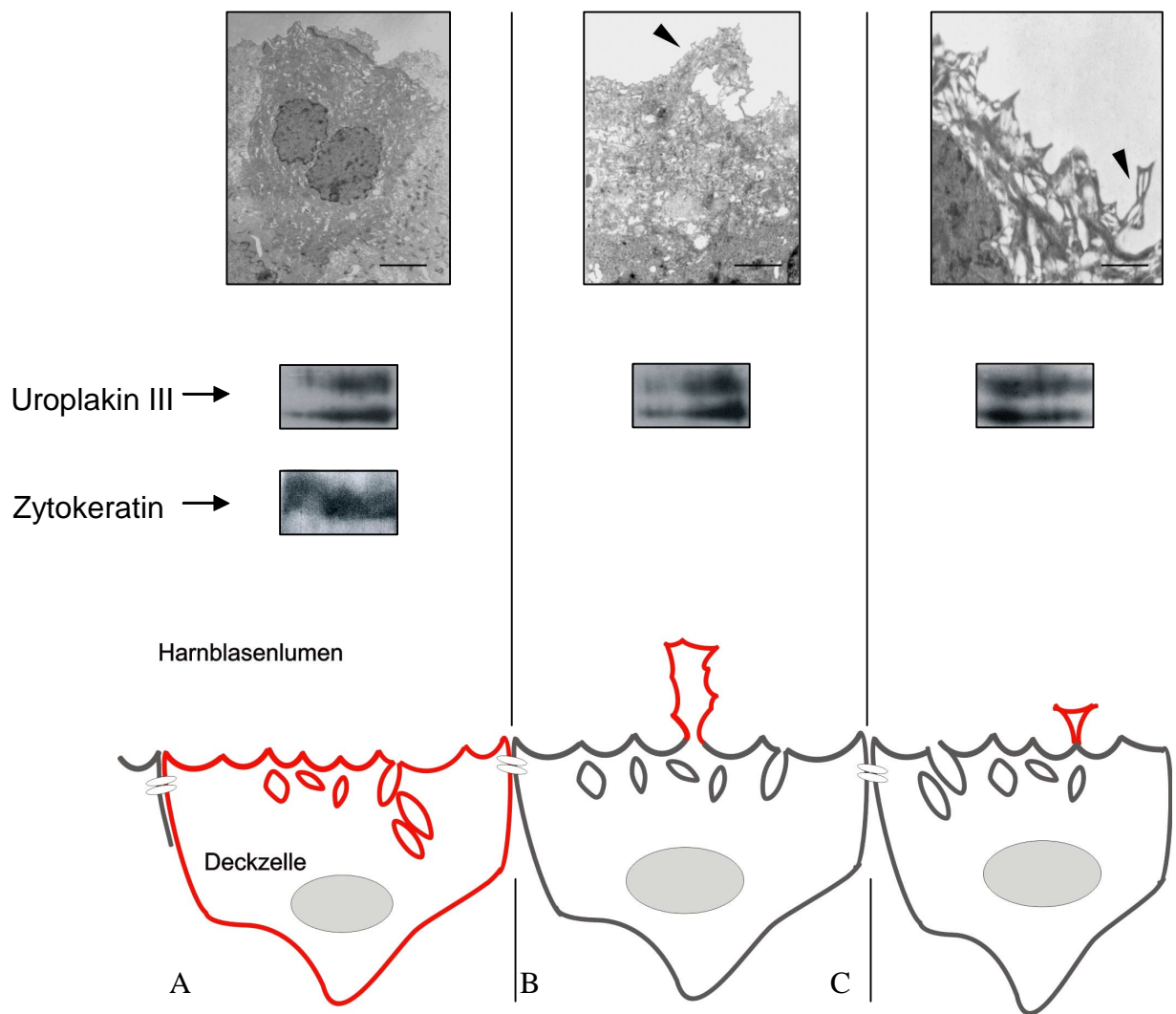


Abb. 25

Nachweis von Uroplakin III in verschiedenen Urinsedimenten. Im unteren Bildabschnitt sind Deckzellen schematisch dargestellt. Die abgegebene Membran ist im schematischen Bild jeweils rot markiert. Im oberen Abschnitt ist die Ultrastruktur im histologischen Schnittbild (60 nm) dargestellt. Es ist möglich, dass bei Zentrifugationen geringer g-Zahl (A) größere Zellbestandteile oder ganze Zellen abgegeben werden. Der immunologische Nachweis von Zytokeratin als Bestandteil des Zytoskeletts lässt diese Vermutung zu. Auch kleinere Membranteile (Pfeil) können abgegeben werden (B). Nach Ultrazentrifugation konnte Uroplakin III ebenfalls nachgewiesen werden. Es wäre möglich das es zum Abknospen kleinster Membranabschnitte, eventuell auch einzelner Vesikel kommt (Pfeil in C).

(Bar 2,5  $\mu\text{m}$ [A], 1  $\mu\text{m}$ [B], 0,4  $\mu\text{m}$ [C]).

Die Ausscheidung von Uroplakin im Urin lässt die Annahme zu, dass Uroplakin als Markerprotein für pathologische Veränderungen im Urothel geeignet ist.

Blasenkarzinome stellen ca. 3 % aller malignen Erkrankungen. Bei den Harnblasentumoren handelt es sich fast ausschließlich um Urothelzellkarzinome (Freudenberg, 1989). In der Differenzierung dieser Tumoren, wie z. B. Brennertumoren, die den Urothelzellkarzinomen zugeordnet werden, konnte Uroplakin III spezifisch detektiert werden. In anderen Tumoren, z. B. im Mammakarzinom, wird Uroplakin nicht exprimiert (Kaufmann et al., 2000). Aufgrund unserer Ergebnisse könnte Uroplakin als histologischer Marker für metastatische Urothelzellkarzinome eingesetzt werden. Eine maligne Transformation ist mit einer Expression spezifischer Differenzierungsleistung vereinbar (Moll et al., 1993). Da die meisten Urothelzellkarzinome dem ableitenden Harnsystem zugänglich sind, wäre eine Frühdiagnostik im Urin denkbar. Eine quantitative Zunahme von Uroplakin im Urin bei Karzinomwachstum ist wahrscheinlich, da es sich um einen turn over von differenzierten Deckzellen handelt.

Bisher wird untersucht, ob nukleäre Matrixproteine als Screeningtest auf Urothelzellkarzinome eingesetzt werden können. Tumore, welche durch die konventionelle Zytologie nicht erfasst und diagnostiziert werden, können in einem frühen Stadium durch die Detektion von nukleärem Matrixprotein (NMP 22) entdeckt werden (Akaza and Miyana, 1997). Dieser Einsatz setzt eine Mikrohämaturie voraus und ist durch eine vermehrte Freisetzung von NMP bei entzündlichen Veränderungen der Harnblase stark eingeschränkt.

Eine tumorspezifische Veränderung der Uroplakinkonzentration im Urin von Patienten könnte Hinweise auf die pathologische Genese intraurethraler Prozesse geben.

## 7 Zusammenfassung

Die Deckzellen des Urothels sind mit ihrem apikalen Zellpol dem Urin und damit unter Umständen auch zellschädigenden Substanzen direkt ausgesetzt. Als Schutzmaßnahme haben diese Zellen neben gut ausgebildeten Zonulae occludentes, die eine parazelluläre Passage des Urins sicher verhindern, eine spezialisierte apikale Plasmamembran, die Urothel-Plaques enthält. Die Membran ist elektronenmikroskopisch dicker als die normale Zellmembran und ist durch den Einbau des integralen Membranproteins Uroplakin asymmetrisch. Uroplakin III, ist das am häufigsten im Urothel vorhandene Protein mit einer Größe von 47 kDa. Es bildet sehr regelmäßige hexagonale Strukturen aus, die in einer fast parakristallinen Anordnung vorliegen und den Plaques ihre Rigidität und hohe chemische Resistenz verleihen. In den Zellen werden die Urothel-Plaques in der Membran von Vesikeln gespeichert und verschmelzen durch einen Fusionsvorgang mit der apikalen Plasmamembran. Der Mechanismus dieser Fusion war nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit ist untersucht worden, ob bei der Fusion der Reservevesikel mit der apikalen Plasmamembran SNARE-Proteine eine Rolle spielen. Mittels Immunopräzipitation konnte gezeigt werden, daß im Urothel der Ratte die SNARE-Proteine Synaptobrevin, Syntaxin und SNAP 23, die epitheliale Isoform von SNAP 25, vorkommen. Sie bilden wie von der neuronalen Vesikelfusion bekannt, den Kernkomplex, der für die Fusion eine Grundvoraussetzung darstellt.

In licht- und elektronenmikroskopischen Studien konnte die subzelluläre Lokalisation der SNARE-Proteine in den Deckzellen des Urothels gezeigt werden. Die SNARE-Proteine sind entlang der apikalen Plasmamembran und der direkt darunter liegenden Schicht nachweisbar.

Die Frage nach dem Verbleib der ständig neu eingebauten Membranbestandteile konnte nicht hinreichend beantwortet werden. Hinweise auf eine endozytotische Internalisierung verletzter Membranbestandteile oder defekter Urothel-Plaques konnten nicht gefunden werden. Der Prozess des Abknospens von gealterten Membranabschnitten und deren Abgabe mit dem Urin konnte daher als wahrscheinlich angenommen werden.

Mittels Westernblotanalyse gelang der Nachweis von Uroplakin in humanem Urin gesunder Probanden. Diese kontinuierliche Abgabe von Membranbestandteilen des Urothels bedeutet einen bemerkenswerten Proteinverlust.

## **Abkürzungen**

alpha-SNAP	alpha-soluble NSF attachment protein
A.	Arteria
APS	Ammoniumpersulfat
ATPase	Adenosintriphosphatase
AUM	Asymmetric unit membrane
BME	beta-Mercaptoethanol
CK	Zytokeratin
DDSA	Dodecylbernsteinsäureanhydrid
DMP	Trisdimethylaminomethylphenol
GTP	Guanosintriphosphat
int.	internum
Ligg.	Ligamenta
LMW	Light molecular weight
MDCK	Madin–Darby Canine Kidney
NMP–22	Nukleäres Matrixprotein
NSF	N–ethylmaleimid–sensitive factor
Q–SNARE	Glutamin–SNARE
Rab	Ras related GTP–binding protein
R–SNARE	Argenin–SNARE
SDS–PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis
SNAP 25	Synaptosomal associated protein of 25 kDa
SNARE	SNAP–Rezeptor

t-SNARE

target-SNARE

TeNt

Tetanus Neurotoxin

UP

Uroplakin

V.

Vena

v-SNARE

vesicle-SNARE

VAMP

vesicle-associated membrane proteins

## Literaturverzeichnis

Anderson 1981:

Anderson, D. J. and C. Peterson. High resolution electrophoresis of proteins in SDS polyacrylamid gels. In: Radpla, B. J. (ed) Electrophoresis. de Gruyter Berlin 41 – 48

Becher 2000:

Becher, A., A. Drenckhahn, I. Pahner, M. Margittai, R. Jahn and G. Ahnert–Hilger. The synaptophysin–synaptobrevin complex—a hallmark of synaptic vesicle maturation. *J Neurosci* 19, 1922 – 1931

Bennet 1993:

Bennet, M.K. and R.H. Scheller. The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2559 – 2563

Benninghoff 1994:

Benninghoff. Hrsg. Drenckhahn, D. und W. Zenker. Anatomie: makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen 1. 110 – 111 Urban&Schwarzenberg München

Born 1999:

Born, M., G. Ahnert–Hilger und T. Jöns. Zur Bedeutung von SNARE–Proteinen im Urothel der Ratte. *Anat Anz* 182, 151

Burnette 1981:

Burnette, W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radioionated protein A. In: *Anal Biochem* 112, 195 – 203

Calakos 1994:

Calakos, B.C., M.K. Bennet, K.E. Peterson and R.H. Scheller. Protein–protein interactions contributing to the specificity of intracellular vesicular trafficking. *Science* 263, 1146 – 1149

Cao 1998:

Cao X., N. Ballew and C. Barlowe. Initial docking of ER–derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *EMBO J* 17, 2156 – 2165

Caplan 1997:

Caplan, M.J. Membrane polarity in epithelial cells: protein sorting and establishment of polarized domains. *Am J Physiol* 272, F425 – 429

Chang 1994:

Chang, A., T.G. Hammond, T.T. Sun and M.L. Zeidel. Permeability properties of the mammalian bladder apical membrane. *Am J Physiol* 267, C1483 – 1492

Dong 1999:

Dong, C. and S. W. Whiteheart. Intracellular Localisation of SNAP–23 to Endosomal Compartments. *Biochem Biophys Res Comm* 255, 340 – 346

Drenckhahn 1986:

Drenckhahn, D. and H. Franz. Identification of actin-, alpha- and vinculin–containing plaques at the lateral membrane of epithelial cells. *J Cell Biol* 102, 1843 – 1852

Drubin 1996:

Drubin, D.G. and W.J. Nelson. Origins of cell polarity. *Cell* 84, 335 – 344

Edelmann 1995:

Edelmann, L., P.I. Hanson, E.R. Chapman and R. Jahn. Synaptobrevin binding to synaptophysin; apotential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J* 14, 224 – 231

Fujita 1998:

Fujita, H., P.L. Tuma, C.M. Finnegan, L. Locco and A.L. Hubbard. Endogenous syntaxins 2, 3 and 4 exhibit distinct but overlapping patterns of expression at the hepatocyte plasma membrane. *Biochem J* 329, 527 – 538



Gua 1998:

Guo, Z., C. Turner and D. Castle. Relocation of the t – SNARE SNAP 23 from Lamellipodia – like Cell Surface Projections Regulates Compound Exocytosis in Mast Cells. *Cell* 95, 537 – 548

Hepp 1999 :

Hepp, R., M. Perraut, S. Chasserot–Glaz, T. Galli, D. Aunis, K. Langley and N. J. Grant. Cultured Glial Cells Express the SNAP–25 Analogue SNAP–23. *Glia* 27, 181 – 187

Hess 1992:

Hess, D. T., T. M. Slater, M. C. Wilson and J. H. Skene. The 25 kDa synaptosomal–associated protein SNAP–25 is the major methionine–rich polypeptide in rapid axonal transport and a major substrate for palmitoylation in adult CNS. *J Neurosci* 12, 4634 – 4641

Hicks 1966:

Hicks, R. M. The function of the Golgi Complex in transitional epithelium. Synthesis of the thick cell membrane. *J Cell Biol* 30, 623 – 643

Jahn 1999:

Jahn, R. and T. C. Südhof. Membrane Fusion and Exocytosis. *Annu Rev Biochem* 68, 863 – 911

Jahn 1994:

Jahn, R. and T. C. Südhof. Synaptic vesicles and exocytosis. *Annu Rev Neurosci* 17, 219 – 246

Jezernik 1993:

Jezernik, K. and N. Pipan. Blood–urine barrier formation in mouse urinary bladder development. *Anat Rec* 235, 533 – 538

Jo 1995:

Jo, I., H. W. Harris, A. M. Amendt Raduege, R. R. Majewski and T. G. Hammond. Rat kidney papilla contains abundant synaptobrevin protein that participates in the fusion of antidiuretic hormone–regulated water channel–containing endosomes in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 1876 – 1880

Jöns 1999:

Jöns, T., S. Lehnardt, H. Bigalke, H. Heim and G. Ahnert–Hilger. SNARE proteins and rab 3A contribute to canalicular formation in parietal cells. *Engl J Cell Biol* 78, 779 – 786

Jöns 1994:

Jöns, T., B. Warrings, A. Jöns and D. Drenckhahn. Basolateral localization of anion exchanger (AE2) and actin in acid–secretion (parietal) cells of the human stomach. *Histochemistry* 102, 255 – 63

Johnson 1984:

Johnson, D. A., J. W. Gautsch, J. Sportsman R. and J. R. Elder. Improved technique utilizing non–fat milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. In: *Gene Anal Tech* 1: 3 - 8

Kachar 1999:

Kachar, B., F. Liang, U. Lins, M. Ding, X. Wu, D. Stoffler, U. Aebi and T. T. Sun. Three–dimensional Analysis of the 16nm urothelial plaque particle: Luminal surface exposure, preferential head–to–head interaction and hinge formation. *J Mol Biol* 285, 595 – 608

Kaufmann 2000:

Kaufmann, O., J. Volmering and M. Dietel. Uroplakin III is a highly specific and moderately sensitive immunohistochemical marker for primary and metastatic urothelial carcinomas. *Am J Clin Pathol* 113, 683 – 687

Koss 1969:

Koss, L. G. The asymmetric unit membranes of the epithelium of the urinary bladder of the rat. An electron microscope study of a mechanism of epithelial maturation and function.

Lehnardt 2000:

Lehnardt S., G. Ahnert-Hilger, H. Bigalke and T. Joens. Acid secretion of parietal cells is paralleled by a redistribution of NSF and alpha, beta-SNAPs and inhibited by tetanus toxin. *Histochem Cell Biol* 114, 387 – 391

Leonhardt 1990:

Leonhardt, H.: Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. S. 101, 8. Aufl., Stuttgart: Thieme

Leonhardt 1986:

Leonhardt, H. Taschenatlas der Anatomie. Bd. 2 Innere Organe. S. 268, 5. Aufl., Stuttgart: Thieme

Liang 2001:

Liang, F. X., I. Riedel, F. M. Deng, G. Zhou, C. Xu, X. R. Wu, X. P. Kong, R. Moll and T. T. Sun. Organization of uroplakin subunits: transmembrane topology, pair formation and plaque composition. *Biochem J* 355, 13 – 18

Low 1998:

Low, S., P. A. Roche, H. A. Anderson, S. C. D. v. Ijzendoorn, M. Zhang, K. E. Mostov and T. Weimbs. Targeting of SNAP 23 and SNAP 25 in polarized epithelial cells. *J Biol Chem* 273, 3422 – 3430

McMahon 1996:

McMahon, H. T. and T. C. Südhof. Synaptic core complex of Synaptobrevin, Syntaxin and SNAP 25 forms high affinity alpha – SNAP binding site. *J Biol Chem* 270, 2213 – 2217

Moll 1993:

Moll, R., J. Laufer, X. R. Wu und T. T. Sun. Uroplakin III, ein spezifisches Membranprotein von urothelialen Deckzellen, als histologischer Marker für metastatische Urothelzellkarzinome. *Verh Dtsch Ges Path* 77, 260 – 265

Moll 1992:

Moll, R., A. Löwe, J. Laufer and W.W. Franke. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 140, 427 – 447

Moll 1982:

Moll, R., D.L. Schiller, W.W. Franke, B. Geiger and R.Krepler. The catalog of Human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelial tumors and cultered cell. *Cell* 31, 11 – 24

Nichols 1998:

Nichols, B. J. and H. R. Pelham. SNAREs and membrane fusion in the Golgiapparatus. *Biochem Biophys Acta* 1404, 9 – 31

Nichols 1997:

Nichols, B. J., C. Ungermann, H. R. Pelham, W. T. Wickner and A.Haas. Homotypic vacular fusion mediated by t- and v-SNAREs. *Nature* 387, 199 – 202

Parlati 1999:

Parlati, F., T. Weber, J. A. McNew, B. Westerman, T. H. Söllner and J. E. Rothmann. Rapid and efficient fusion of phospholipid vesicles by the alpha-helical core of a SNARE complex in the absence of an Nterminal regulatory domain. *PNAS* 96, 12565 – 12570

Peng 1997:

Peng, X. R., X. Yao, D. C. Chow, J. G. Forte and M. K. Bennet. Association of syntaxin 3 and vesicle-associated membrane protein (VAMP) with H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase containing tubulovesicles in gastric parietal cells. *Mol Biol Cell* 8, 399 – 407

Porter 1973:

Porter, K. R. and M. A. Bonneville. An introduction to the fine structure of cells and tissues. 4th ed., Philadelphia: Lea & Febiger

- Pschyrembel 1994:  
Pschyrembel. Hrsg. Hildebrandt, H. Klinisches Wörterbuch: 257., S.424 Berlin, New York: de Gruyter
- Ravichandran 1996:  
Ravichandran, V., A. Chawla and P. A. Roche. Identification of a novel syntaxin- and synaptobrevin / VAMP-binding protein, SNAP-23, expressed in non-neuronal tissues. *J Biol Chem* 271, 13300 – 13303
- Romih 1999:  
Romih, R., P. Veranič and K. Jezernik. Actin filaments during terminal differentiation of urothelial cells in the rat urinary bladder. *Histochem Cell Biol* 112, 375 – 380
- Romih 1998:  
Romih, R., K. Jezernik and A. Mašera. Uroplakins and cytokeratins in the regenerating rat urothelium after sodium saccharin treatment. *Histochem Cell Biol* 109, 263 – 269
- Rothmann 1997:  
Rothman, J. E. and T.H. Söllner. Throttles and dampers: controlling the engine of membrane fusion. *Science* 276, 1212 – 1213
- Rothmann 1996:  
Rothman, J. E. and F. T. Wieland. Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272, 227 – 234
- Rothmann 1994:  
Rothmann, J. E. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55 – 63
- Rothmann 1994:  
Rothman, J. E. and G. Warren. Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr Biol* 4, 220 – 233
- Simons 1990:  
Simons, K. and A. Wandinger Ness. Polarized sorting in epithelia. *Cell* 62, 207 – 210
- Söllner 1993:  
Söllner, T., M. K. Bennet, S. W. Whiteheart, R. H. Scheller and J. E. Rothman. A protein assembly–disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation and fusion. *Cell* 75, 409 – 418
- Südhof 1995:  
Südhof, T. C. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein–protein interactions. *Nature* 375, 645 – 653
- Südhof 1991:  
Südhof, T.C. and R. Jahn. Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron* 6, 665 – 677
- Truschel 1999:  
Truschel, S. T., W. G. Ruiz, T. Shulman, J. Pilewski, T. T. Sun, M. L. Seidel and G. Apodaca. Primary Urothelial Cultures–A Model System to analyze umbrella cell barrier function. *J Biochem Mol Biol* 274, 15020 – 15029
- Ungermann 1998a:  
Ungermann, C., K. Sato and W. Wickner. Defining the functions of trans–SNARE pairs. *Nature* 396, 543 – 548
- Ungermann 1998b:  
Ungermann, C., B. J. Nichols, H. R. B. Pelham and W. Wickner. A Vacuolar v–t–SNARE Complex, the Predominant Form In Vivo and on Isolated Vacuoles, Is Disassembled and Activated for Docking and Fusion. *J Cell Biol* 140, 61 – 69
- Veit 1996:  
Veit, M., T. H. Söllner and J. E. Rothman. Multiple palmitoylation of synaptotagmin and the

t–snare SNAP–25. FEBS Lett 385, 119 – 123

Waldeyer 1993:

Waldeyer, A. und A. Mayet.: Anatomie des Menschen 1. S. 356 – 361, 16. Aufl., Berlin: deGruyter

Wang 1997:

Wang, G., J. W. Witkin, G. Hao, V. A. Bankaitis P. E. Scherer and G. B. Syndet is a novel SNAP–25 related protein expressed in many tissues. J Cell Sci 110, 505 – 513

Weimbs 1997:

Weimbs, T., S. H. Low, S. J. Chapin, K. E. Mostov, P. Bucher and K. Hofmann. A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily. Proc Natl Acad Sci USA 94, 3046 – 3051

Wilson 1989:

Wilson, D. W., C. A. Wilcox, G. C. Flynn, E. Chen, W. J. Kuang, W. J. Henzel, M. R. Block, A. Ullrich and J. E. Rothmann. A fusion protein required for vesiclemediated transport in both mammalian cells and yeast. Nature 339, 355 – 359

Wong 1997:

Wong, P. P., N. Daneman, A. Volchuk, N. Lassam, M. C. Wilson, A. Klip and W. S. Trimble. Tissue distribution of SNAP–23 and it's subcellular localization in 3T3–L1 cells. Biochem Biophys Res Commun 230, 64 – 8

Wu 1993:

Wu, X. R. and T. T. Sun. Molecular cloning of a 47 kDa tissue–specific and differentiation–dependent urothelial cell surface glycoprotein. J Cell Sci 106, 31 – 43

### **Danksagung**

Mein Dank gilt Prof. Dr. Thomas Jöns für die Möglichkeit, mit ihm wissenschaftlich zu arbeiten und von ihm lernen zu dürfen. Ich danke ihm für die Überlassung des Themas, die freundliche Aufnahme sowie für zahlreiche kritische Anregungen und die gewährte Offenheit.

Den Mitarbeitern im Institut für Anatomie danke ich vor allem für die methodische Unterstützung, das gute Arbeitsklima und viele anregende Worte.

Insbesondere danke ich Frau Dr. Ingrid Pahner für die methodische Anleitung in der Elektronenmikroskopie, Frau Mayer für gute technische Unterstützung und dem Photolabor des Instituts für Anatomie.

Für die Beratung in Fragen der Statistik danke ich Frau Dr. Küchler aus dem Institut für medizinische Biometrie der Charité.

Mein Dank gilt meinen Eltern, Freunden und Kommilitonen die immer zu Hilfe waren und mich bei der Anfertigung des Manuskriptes unterstützten.

Berlin, am 14.01.2003

Martin Born